



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑯ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift  
⑯ EP 0 637 999 B 1  
⑯ DE 693 22 774 T 2

⑯ Int. Cl. 6:  
B 01 L 7/00  
B 01 L 3/00  
C 12 Q 1/68  
B 01 J 19/00

DE 693 22 774 T 2

⑯ Deutsches Aktenzeichen: 693 22 774.5  
⑯ PCT-Aktenzeichen: PCT/US93/04039  
⑯ Europäisches Aktenzeichen: 93 910 907.0  
⑯ PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 93/22058  
⑯ PCT-Anmeldetag: 29. 4. 93  
⑯ Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: 11. 11. 93  
⑯ Erstveröffentlichung durch das EPA: 15. 2. 95  
⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: 23. 12. 98  
⑯ Veröffentlichungstag im Patentblatt: 17. 6. 99

|  |  |
|--|--|
| ⑯ Unionspriorität:   | ⑯ Erfinder:  |
| 877536 01. 05. 92 US   | WILDING, Peter, Paoli, PA 19301, US; KRICKA, Larry, J., Berwyn, PA 19312, US |
| 877661 01. 05. 92 US   |  |
| 877662 01. 05. 92 US   |  |
| 877701 01. 05. 92 US   |  |
| 877702 01. 05. 92 US   |  |
| ⑯ Patentinhaber:   |  |
| Trustees of the University of Pennsylvania,<br>Philadelphia, Pa., US         |  |
| ⑯ Vertreter:   |  |
| Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München                                       |  |
| ⑯ Benannte Vertragstaaten:   |  |
| AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL                           |  |
| ⑯ POLYNUKLEOTIDE AMPLIKATIONSANALYSE MIT EINER MIKROFABRIZIERTEN VORRICHTUNG |  |

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 693 22 774 T 2

27.01.99

93 910 907.0  
EP 0 637 999

### Hintergrund der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Verfahren und Vorrichtungen zur Durchführung von Analysen. Insbesondere betrifft sie die Konstruktion kleiner, typischerweise einmal verwendbarer Module, die zu Analysen unter Anwendung von Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in der Lage sind.

In den letzten Jahrzehnten wurden auf dem Gebiet der Erfindung sehr viele Arbeitsvorschriften, Testsets und Patronen zur Durchführung von Analysen auf biologischen Proben für unterschiedliche Diagnose- und Kontrollzwecke entwickelt. Immunassays, Agglutinationsassays und Analysen auf der Grundlage von Polymerase-Kettenreaktion, verschiedene Liganden-Rezeptör-Wechselwirkungen und Differentialmigration von Spezies in einer komplexen Probe wurden alle dazu herangezogen, die Gegenwart oder Konzentration verschiedener biologischer Verbindungen oder Schmutzstoffe oder die Gegenwart bestimmter Zelltypen zu bestimmen.

In jüngster Zeit wurden kleine Einwegvorrichtungen zur Handhabung biologischer Proben und Durchführung bestimmter klinischer Tests entwickelt. Shoji et al. berichteten über die Verwendung eines Miniatur-Blutgasanalysegeräts auf einem Siliziumwafer. Shoji et al., Sensors and Actuators 15, 101-107 (1988). Sato et al. berichteten über ein Zellfusionsverfahren unter Verwendung mikromechanischer Siliziumvorrichtungen. Sato et al., Sensors and Actuators A21-A23, 948-953 (1990). Die Ciba Corning Diagnostics Corp. (USA) stellte ein mikroprozessor-gesteuertes Laserphotometer zum Nachweis der Blutgerinnung her.

Die Mikro-Materialbearbeitung entwickelte sich auf der Grundlage der Mikroelektronik. Angell et al., Scientific American 248, 44-55 (1983). Die Mikro-Materialbearbeitung ermöglichte die Herstellung von mikrofabrizierten Vorrichtungen mit Strukturelementen mit minimalen Dimensionen, die von einigen Dutzend Mikrometern (den Dimensionen biologischer Zellen) bis Nanometern (den Dimensionen einiger biologischer Makro-

moleküle) reichen. Dieser Maßstab wird hierin als "Mesoscale" bezeichnet. Die meisten Experimente mit Mesoscale-Strukturen umfaßten Untersuchungen der Mikromechanik, d.h. mechanischer Bewegungs- und Strömungseigenschaften. Das Potential von Mesoscale-Strukturen wurde in den Naturwissenschaften noch nicht vollständig ausgeschöpft.

Brunette (Exper. Cell Res. 167, 203-217 (1986) und 164, 11-26 (1986)) untersuchte das Verhalten von Fibroblasten und Epithelzellen in Rillen in Silizium, titanbeschichteten Polymeren und dergleichen. McCartney et al. (Cancer Res. 41, 3046-3051 (1981)) untersuchten das Verhalten von Tumorzellen in gerillten Kunststoffsubstraten. LaCelle (Blood Cells 12, 179-189 (1986) untersuchte Leukozyten- und Erythrozyten-Fluß in Mikrokapillaren, um Einblicke in den Mikrokreislauf zu gewinnen. Hung und Weissman berichteten über eine Studie der Fluideodynamik in mikrofabrizierten Kanälen, lieferten aber keine Daten zur Analysenvorrichtung. Hung et al., Med. and Biol. Engineering 9, 237-245 (1971); und Weissman et al., Am. Inst. Chem. Eng. J. 17, 25-30 (1971). Columbus et al. verwendeten einen Sandwich aus zwei orthogonal ausgerichteten Folien mit aufgeprägter V-Rille zur Steuerung des Kapillarflusses biologischer Flüssigkeiten zu diskreten ionenselektiven Elektroden in einer experimentellen Mehrkanalvorrichtung. Columbus et al., Clin. Chem. 33, 1531-1537 (1987). Masuda et al. und Washizu et al. berichteten über die Verwendung einer Flüssigkeitsströmungskammer zur Manipulation von Zellen (z.B. Zellfusion). Masuda et al., Proceedings IEEE/IAS Meeting, S. 1549-1553 (1987); und Washizu et al., Proceedings IEEE/IAS Meeting, S. 1735-1740 (1988). Auf dem Gebiet wurde das Potential der Verwendung von Mesoscale-Vorrichtungen zur Analyse biologischer Flüssigkeiten noch nicht voll ausgeschöpft.

Techniken zur Verwendung von PCR zum Amplifizieren eines DNA-Segments sind allgemein bekannt (siehe z.B. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; S. 14.1-14.35). Eine PCR-Amplifizierungsreaktion kann auf einem DNA-Templat unter Verwendung einer wärmestabilen DNA-Polymerase, z.B. Taq-DNA-Polymerase (Chien et al., J. Bacteriol. 127, 1550 (1976)), Nukleosidtriphosphaten und zwei Oligonukleotiden mit unterschiedlichen Sequenzen,

27.01.99

die komplementär zu Sequenzen sind, die auf gegenüberliegenden Strängen der Templat-DNA liegen und das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren ("Primer"), durchgeführt werden. Die Reaktionskomponenten werden zwischen einer höheren Temperatur (z.B. 94°C) zum Dehybridisieren ("Schmelzen") doppelstrangiger Templat-DNA und dann einer niedrigeren Temperatur (z.B. 65°C) zum Annelieren und Polymerisieren zyklisch thermisch behandelt. Ein kontinuierlicher Reaktionszyklus zwischen Dehybridisierungs-, Annelier- und Polymerisations-Temperatur sorgt für exponentielle Amplifizierung der Templat-DNA. Beispielsweise kann bis zu 1 µg Ziel-DNA von bis zu 2 kb Länge mit 30-35 Amplifizierungszyklen aus nur  $10^{-6}$  µg Ausgangs-DNA erhalten werden. Maschinen zur Durchführung automatisierter PCR-Kettenreaktionen unter Verwendung eines thermischen Zyklierers sind erhältlich (Perkin Elmer Corp.). Ein thermischer Zyklierer zur Verwendung in PCR-Reaktionen wird auch in der EP-A-402.995 beschrieben.

PCR-Amplifizierung wurde auf die Diagnose genetischer Störungen (Engelke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 544 (1988)), die Detektion von Nukleinsäuresequenzen pathogener Organismen in klinischen Proben (Ou et al., Science 239, 295 (1988)), die genetische Identifikation gerichtsmedizinischer Proben, wie z.B. Sperma (Li et al., Nature 335, 414 (1988)), die Analyse von Mutationen in aktivierten Onkogenen (Farr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 1629 (1988)) und auf viele Aspekte molekularer Klonierung (Oste, Bio-Techniques 6, 162 (1988)) angewendet. PCR-Assays können für eine Vielzahl von Anwendungen herangezogen werden: Bildung spezifischer Sequenzen klonierter doppelstrangiger DNA zur Verwendung als Sonden, Bildung von für unklonierte Gene spezifischen Sonden durch selektive Amplifizierung bestimmter cDNA-Segmente, Bildung von cDNA-Sammlungen aus geringen mRNA-Mengen, Bildung großer Mengen an DNA zum Sequenzieren und zur Analyse von Mutationen. Es besteht die Notwendigkeit, geeignete, rasche Systeme zur PCR-Analyse zu entwickeln, die einer Vielzahl potentieller Anwendungen in klinischen Tests, wie z.B. Vaterschaftstests und Untersuchungen über genetische und infektiöse Krankheiten, zugeführt werden können.

27.01.99

In einem Aspekt liefert die Erfindung analytische Systeme mit optimalen Reaktionsumgebungen, die Mikrovolumina von Proben analysieren, sehr geringe Konzentrationen eines Polynukleotids detektieren und rasch analytische Ergebnisse liefern können. Die Erfindung kann auch leicht in Massenfertigung produzierte, kleine (z.B. mit einem Volumen von weniger als 1 cm<sup>3</sup>) Einwegvorrichtungen mit funktionellen Mesoscale-Elementen bereitstellen, die zu raschen, automatisierten PCR-Analysen einer vorbestimmten Zelle oder zellfreien Probe in einer Reihe von Anwendungen fähig sind. Die Erfindung liefert auch eine Gruppe von Vorrichtungen, die jeweils dazu dienen können, eine Reihe rascher klinischer Tests durchzuführen, z.B. Tests hinsichtlich viraler oder bakterieller Infektion, Tests hinsichtlich kontaminierender Zellkultursubstanzen oder Tests auf Gegenwart rekombinanter DNA oder eines Gens in einer Zelle und dergleichen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

Die Erfindung liefert eine Gruppe kleiner, massengefertigter, typischerweise nur einmal verwendeter Vorrichtungen zur Durchführung einer Polynukleotid-Polymerisationsreaktion, um die rasche Amplifizierung eines Polynukleotids in einer Probe zu ermöglichen. In einer Ausführungsform umfaßt die Vorrichtung ein festes Substrat mit einer Dicke in der Größenordnung einiger Millimeter und einer Fläche von etwa 0,2 bis 2,0 cm<sup>2</sup>, das mikrofertigt ist, um eine Probeneinlaßöffnung und ein Mesoscale-Durchflußsystem zu definieren. Das Durchflußsystem der Vorrichtung enthält einen Probendurchflußkanal, der sich von der Einlaßöffnung weg erstreckt, und eine Polynukleotid-Polymerisationsreaktionskammer in Fluidkommunikation mit dem Durchflußkanal-Polynukleotid. Der Ausdruck "Mesoscale" definiert hierin Kammern und Strömungsdurchgänge mit einem Querschnitt in der Größenordnung von 0,1 bis 500 µm, wobei eine bevorzugte Reaktionskammer-Breite in der Größenordnung von 2,0 bis 500 µm, noch bevorzugter 3 bis 100 µm, liegt. Für zahlreiche Anwendungen sind Kanäle einer Breite von 5-50 µm geeignet. Kammern im Substrat, in denen Amplifizierung erfolgt, besitzen etwas größere Dimensionen, z.B. 1-5 mm. Bevorzugte Reaktionskammern- und Kanaltiefen liegen in der Größenordnung von 0,1-100 µm, typischerweise 2-50 µm. Die Durchflußkanäle in

27.01.99

den Vorrichtungen, die zu den Reaktionskammern führen, besitzen bevorzugte Breiten in der Größenordnung von 2,0-200  $\mu\text{m}$  und Tiefen in der Größenordnung von 0,1-100  $\mu\text{m}$ .

In einer Ausführungsform können die Vorrichtungen zur Durchführung einer PCR in der Reaktionskammer verwendet werden. Die Reaktionskammer kann Reagenzien für PCR enthalten, z.B. ein Proben-Polynukleotid, Polymerase, Nukleosidtriphosphate, einen ersten Primer, der mit dem Proben-Polynukleotid hybridisierbar ist, und einen zweiten Primer, der mit einer Sequenz hybridisierbar ist, die zum Proben-Polynukleotid komplementär ist, worin der erste und zweite Primer die Termini des polymerisierten Polynukleotid-Produkts definieren. Die Vorrichtung kann auch Mittel zum zyklischen thermischen Behandlung des Inhalts der PCR-Kammer enthalten, sodaß in jedem Zyklus die Temperatur gesteuert wird, um 1) doppelstrangiges Polynukleotid zu dehybridisieren ("schmelzen"), 2) die Primer an einstrangiges Polynukleotid zu annelieren und 3) amplifiziertes Polynukleotid zwischen den Primern zu synthetisieren. In einer Ausführungsform kann die PCR-Kammer einen Abschnitt umfassen, der hintereinander auf die für PCR erforderlichen Temperaturen zyklisch thermisch behandelt wird. Alternativ dazu kann die PCR-Kammer zwei oder mehrere Abschnitte umfassen, die auf die unterschiedlichen zur Dehybridisierung, Annelierung und Polymerisation erforderlichen Temperaturen eingestellt sind, in welchem Fall die Vorrichtung außerdem ein Mittel zur zyklischen thermischen Behandlung des Inhalts der Kammer zwischen den Abschnitten zur Durchführung der PCR umfaßt, z.B. eine Pumpe oder ein anderes hierin geöffnetes Mittel. Die Vorrichtung kann ferner ein Mittel zum Detektieren des amplifizierten Polynukleotids enthalten. Die Vorrichtungen können dazu dienen, eine Reihe automatisierter, sensitiver und rascher Polynukleotid-Analysen durchzuführen, z.B. Analysen auf die Gegenwart von Polynukleotiden in Zellen oder in Lösung oder Analysen auf ein Virus oder Zelltypen unter Nutzung der Gegenwart eines bestimmten Polynukleotids als Marker.

Im allgemeinen umfaßt - wie hierin geoffenbart - das feste Substrat einen Chip, der das Mesoscale-Durchflußsystem und die Reaktionskammer(n) enthält. Die Mesoscale-Durchflußkanäle und Reaktionskammern können aus Silizium und anderen festen Substraten unter Anwendung bekannter Mikrofabrikationsverfahren gefertigt werden. Die Mesoscale-Durchflußsysteme in den Vorrichtungen können durch Mikrofabrikation von Durchflußkanälen und einer oder mehrerer Reaktionskammern in der Oberfläche des Substrats und anschließendes Aufkleben einer Abdeckung, z.B. einer durchsichtigen Glasabdeckung, auf die Oberfläche konstruiert werden. Die Vorrichtungen analysieren Mikrovolumina ( $< 10 \mu\text{l}$ ) einer Probe, die durch eine Einlaßöffnung, die z.B. durch ein Loch definiert ist, das durch das Substrat oder die Abdeckung hindurch kommuniziert, in das Durchflußsystem eingebracht wird. Das Volumen des Mesoscale-Durchflußsystems beträgt typischerweise  $< 5 \mu\text{l}$ , das Volumen der einzelnen Kanäle, Kammern oder anderen funktionellen Elementen oft weniger als  $1 \mu\text{l}$ , z.B. im Nanoliter- oder sogar Picoliter-Bereich. Polynukleotide, die in sehr geringen Konzentrationen (z.B. Nanogramm-Mengen) vorhanden sind, können rasch ( $< 10 \text{ min}$ ) amplifiziert und detektiert werden. Nach dem Abschluß eines Polynukleotid-Polymerisationsassays können die Vorrichtungen entsorgt werden.

Die Chips werden typischerweise mit einem Gerät verwendet, das eine Aufnahmestelle zum Halten des Chips enthält, die mit einer oder mehreren Einlaßöffnungen auf dem Chip mit einer oder mehreren Strömungsleitungen im Gerät zusammenpaßt. Nach dem Einbringen einer Probe einer biologischen Flüssigkeit, von der vermutet wird, daß sie ein bestimmtes Polynukleotid enthält, in die Einlaßöffnung des Substrats wird der Chip im Gerät platziert und eine Pumpe z.B. im Gerät in Gang gesetzt, um die Probe durch das Durchflußsystem zu drängen. Alternativ dazu kann eine Probe durch das Gerät in den Chip injiziert werden. Für den Assay erforderliche Reagenzien, z.B. Polymerase, können der Polynukleotid-Probe vor dem Injizieren in den Chip zugegeben werden. Alternativ dazu können zum Abschluß des Assays erforderliche Reagenzien über eine getrennte Einlaßöffnung, z.B. durch das Gerät, in die Reaktionskammer injiziert werden.

Flüssigkeitsproben und Reagenzien können auch mittels Kapillarwirkung in das Mesoscale-Durchflußsystem eintreten.

In einer Ausführungsform können die Vorrichtungen zur Durchführung eines PCR-Assays verwendet und die Temperatur eines oder mehrere Abschnitte in der Reaktionskammer reguliert werden, indem z.B. einer oder mehrere elektrische Widerstandsheizelemente im Substrat in der Nähe der Reaktionskammer angeordnet werden oder ein gepulster Laser oder eine andere Quelle elektromagnetischer, auf die Reaktionskammer gerichteter Energie eingesetzt wird. Das Gerät kann elektrische Kontakte im Aufnahmehbereich enthalten, die mit in die Struktur des Chips integrierten Kontakten zusammenpassen, z.B. um elektrische Widerstandsheizelemente der Reaktionskammer mit Energie zu versorgen. Ein Kühlelement kann auch im Gerät vorhanden sein, um die Wärme-regulierung der Reaktionskammer zu unterstützen. Das Gerät kann mit herkömmlichen Schaltungssensoren in Kommunikation mit Sensoren in der Vorrichtung zum thermischen Regulieren der PCR-Temperaturzyklen ausgestattet sein, die für die Dehybridisierungs- und Polymerisationsreaktionen erforderlich sind.

Das durch die Polynukleotid-Amplifizierungsreaktion in der Mesoscale-Reaktionskammer erzeugte, amplifizierte Polynukleotid kann durch eine Öffnung im Substrat gesammelt und detektiert werden, z.B. durch Gelelektrophorese oder ein beliebiges anderes Verfahren. Alternativ dazu kann ein Mesoscale-Detektionsbereich im Substrat mikro-fabriziert werden und als Teil des Mesoscale-Durchflußsystems in Fluidkommunikation mit der Reaktionskammer in der Vorrichtung stehen. Der Detektionsbereich kann eine markierte Bindungsgruppe enthalten, z.B. ein markiertes Polynukleotid oder eine Antikörpersonde, das/die zur nachweisbaren Bindung an das amplifizierte Polynukleotid fähig ist. Die Gegenwart von polymerisierten Polynukleotid-Produkt im Detektionsbereich kann z.B. durch optische Detektion der Agglutination des polymerisierten Polynukleotids und der Bindeguppe durch eine Glasabdeckung über dem Detektionsbereich oder durch einen lichtdurchlässigen Abschnitt des Substrats selbst detektiert werden.

Ein positiver Assay kann auch durch detektierbare Änderungen in den Strömungseigenschaften der Flüssigkeitsprobe, z.B. den Änderungen des Drucks oder der elektrischen Leitfähigkeit an unterschiedlichen Punkten im Durchflußsystem nach Produktion von polymerisiertem Polynukleotid in der Reaktionskammer, angezeigt werden. In einer Ausführungsform umfaßt die Vorrichtung ein Mesoscale-Durchflußsystem, das eine Polynukleotid-Amplifizierungsreaktionskammer enthält, und ein Detektionsbereich wird in Kombination mit einem Gerät verwendet, das mit Sensoren ausgerüstet ist, z.B. mit einem Spektralphotometer, das ein positives Ergebnis durch ein optisches Fenster, das z.B. über dem Detektionsbereich angeordnet ist, zur Ablesung ausgeben kann. Das Gerät kann auch ausgelegt sein, elektrische Signale zu empfangen, die eine Drückableitung, Leitfähigkeit und dergleichen anzeigen und in der Reaktionskammer, dem Detektionsbereich oder einem anderen Bereich des Durchflußsystems erfaßt werden.

Das Substrat kann eine Vielzahl an Detektions-/Reaktions-Kammern umfassen, um die rasche parallele Detektion von Polynukleotiden in einem Gemisch zu ermöglichen. Das Mesoscale-Durchflußsystem kann Vorsprünge oder einen Abschnitt mit verringelter Querschnittsfläche aufweisen, um die Lyse von Zellen in der Mikroprobe vor der Abgabe an die Reaktionskammer zu ermöglichen. Scharfkantige Siliziumstücke, die im Strömungsweg eingeschlossen sind, können auch als Lysemittel verwendet werden. Das Mesoscale-Durchflußsystem kann auch einen Zelleinfangbereich enthalten, umfassend eine Bindeguppe, die z.B. an einer Wand eines Durchflußkanals immobilisiert ist, die einen bestimmten Zelltyp in einer heterogenen Zellpopulation bei geringer Flüssigkeitsströmungsgeschwindigkeit bindet und bei höherer Strömungsgeschwindigkeit den Zelltyp vor der Abgabe der Zellen an einen Zell-Lysebereich und dann an eine Reaktionskammer freisetzt. In dieser Ausführungsform wird intrazelluläre DNA oder RNA von einer ausgewählten Zellsubpopulation isoliert und der Mesoscale-Reaktionskammer zwecks Polynukleotid-Analyse in einer Vorrichtung zugeführt.

- In einer weiteren Ausführungsform können Magnetperlen innerhalb des Mesoscale-Durchflußsystems vorhanden sein und entlang des Durchflußsystems durch ein äußeres Magnetfeld, z.B. im Gerät, bewegt werden. In einer Ausführungsform kann eine Polynukleotidsonde auf den Magnetperlen immobilisiert sein, wodurch sich die Perlen an amplifiziertes Polynukleotid in der Reaktionskammer binden können. Magnetperlen, die eine immobilisierte Polynukleotidsonde enthalten, können am Ende eines Assays z.B. durch das Durchflußsystem zur Reaktionskammer transportiert werden, um sich an das polymerisierte Polynukleotidprodukt zu binden. Das gebundene Polynukleotid kann dann auf den Magnetperlen zu einer Detektions- oder Reinigungskammer im Durchflußsystem oder zu einer Sammelöffnung befördert werden.

Einige der Merkmale und Vorteile der Vorrichtungen sind in Tabelle 1 veranschaulicht. Die Vorrichtungen können einen raschen Test zur Detektion pathogener Bakterien oder Viren oder einen Test auf die Gegenwart bestimmter Zelltypen oder Gegenwart eines Gens oder einer rekombinanten DNA-Sequenz in einer Zelle ermöglichen. Die hierin geoffenbarten Vorrichtungen sind alle durch ein Mesoscale-Durchflußsystem gekennzeichnet, das eine PCR-Kammer enthält, die zum Amplifizieren eines Polynukleotids in einer Probe dient, die mit Polymerase oder anderen für PCR erforderlichen Reagenzien versehen sein kann. Die Vorrichtung kann zum Amplifizieren eines Polynukleotids in einer Vielzahl an Anwendungen dienen. Zum Abschluß des Assays wird der Chip üblicherweise entsorgt.

#### TABELLE I

| <u>Merkmal</u>            | <u>Vorteil</u>   |
|---------------------------|--|
| Flexibilität              | Keine Beschränkung hinsichtlich der Anzahl an möglichen Chipkonstruktionen und Anwendungen |
| Reproduzierbarkeit        | Ermöglicht zuverlässige, standardisierte Massenfertigung von Chips.                        |
| Kostengünstige Produktion | Ermöglicht konkurrenzfähige Preise von bestehenden   |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
|                                  | Systemen. Einweg-Charakteristikum für einmalige Anwendung.   |
| Geringe Größe                    | Keine unhandlichen Instrumente erforderlich. Eignet sich für tragbare Einheiten und Systeme, die in nicht-herkömmlichen Laborumgebungen zum Einsatz kommen.                        |
| Microscale                       | Minimale Proben- und Reagensvolumina erforderlich. Verringert Reagenskosten, insbesondere für teurere, spezialisierte Testverfahren. Ermöglicht vereinfachten Instrumenteneinsatz. |
| Sterilität                       | Chips können zur Verwendung in mikrobiologischen Assays und anderen, eine saubere Umgebung erfordern Verfahren sterilisiert werden.  |
| Abgedichtetes System             | Minimiert Biogefahren. Stellt Prozeßintegrität sicher.   |
| Mehrfach-Schaltungsmöglichkeiten | Kann mehrere Prozesse oder Analysen auf einem Chip durchführen. Ermöglicht Plattenassays.  |
| Mehrfach-Detektorfähigkeiten     | Dehnt die Möglichkeiten für Assay- und Prozeßüberwachung auf praktisch das gesamte System aus. Ermöglicht sehr unterschiedliche Anwendungen.                                       |
| Wiederverwendbare Chips          | Reduziert für bestimmte Anwendungen durch den Benutzer zu leistende Prozeßkosten.  |

#### Kurze Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 ist eine schematische Längsschnittansicht einer Vorrichtung der Erfindung, die ein festes Substrat 14 enthält, auf dem ein Mesoscale-Durchflußkanal 20 ausgebildet ist, der mit den Einlaßöffnungen 16 und der PCR-Reaktionskammer 22 verbunden ist und eine durchsichtige, an der Substratoberfläche klebende Abdeckung 12 aufweist.

Fig. 2 ist eine perspektivische Ansicht der Vorrichtung aus Fig. 1.

27.01.99

Fig. 3A ist eine schematische Darstellung einer Analysevorrichtung 10, die in einem schematisch dargestellten Gerät 50 aufgenommen ist, das dazu dienen kann, die Vorrichtung 10 zu stützen, und das Heizelement 57 umfaßt, um die Temperatur der Reaktionskammer 22 in der Vorrichtung 10 zu regulieren.

Fig. 3B ist eine schematische Darstellung einer Analysevorrichtung 10, die im Gerät 50 aufgenommen ist, das zum Stützen der Vorrichtung 10 verwendet werden kann und das Heizelement 53 umfaßt, um die Temperatur der Reaktionskammer 22 in der Vorrichtung 10 zu regulieren.

Fig. 4 ist eine schematische Längsschnittsansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, umfassend ein festes Substrat 14, auf dem der Mesoscale-Durchflußkanal 20 ausgebildet ist, der mit den Einlaßöffnungen 16 und PCR-Reaktionskammerabschnitten 22 verbunden ist, wobei eine durchsichtige, an der Substratoberfläche klebende Abdeckung 12 vorhanden ist.

Fig. 5 ist eine perspektivische Ansicht der Vorrichtung aus Fig. 4.

Fig. 6A ist eine schematische Darstellung einer Analysevorrichtung 10, die im Gerät 50 aufgenommen ist, das zum Stützen der Vorrichtung 10 dient und Heizelemente 57 zum Regulieren der Temperatur der Reaktionskammerabschnitte 22 in der Vorrichtung 10 umfaßt.

Fig. 6B ist eine schematische Darstellung einer Analysevorrichtung 10, die im Gerät 50 aufgenommen ist, das zum Stützen der Vorrichtung 10 dient und das Heizelemente 57 zum Regulieren der Temperatur der Reaktionskammerabschnitte 22A in der Vorrichtung 10 umfaßt.

Fig. 7 ist eine schematische Draufsicht eines Substrats 14, das mit Mesoscale-PCR-Kammerabschnitten 22A und 22B mikrofertigt ist und in Fluidkommunikation mit einer Detektionskammer steht, die aus einem fraktal abzweigenden System von Strömungskanälen 40 besteht, die symmetrisch auf dem Substrat angeordnet sind.

Fig. 8 ist eine Querschnittsperspektive eines Durchflußkanals 20 im Substrat 14 mit zell- oder zellbruchstückfilternden Vorsprüngen 80, die sich von einer Kanalwand erstrecken.

Fig. 9 ist eine Querschnittsperspektive eines Durchflußkanals 20 im Substrat 14 mit zelldurchdringenden Vorsprüngen 90, die sich von einer Kanalwand erstrecken.

Fig. 10 ist eine schematische Draufsicht einer Mesoscale-PCR-Analysevorrichtung, umfassend PCR-Kammerabschnitte 22A und 22B, die im Siliziumsubstrat 14 mikrofertigt sind.

Fig. 11 ist eine schematische Draufsicht einer weiteren Mesoscale-PCR-Analysevorrichtung einschließlich einer im Siliziumsubstrat 14 mikrofertigten PCR-Kammer 22A.

Fig. 12 ist eine schematische Draufsicht einer Analysevorrichtung, die mit einer Reihe von Mesoscale-Kammern versehen ist, die sich zur Durchführung einiger Aufgaben, wie z.B. Zellsortieren, Zell-Lysieren und PCR-Analyse, eignen.

Fig. 13 ist eine schematische Draufsicht einer Analysevorrichtung, die mit einem Paar fraktal abzweigender Strömungskanäle 40 versehen ist.

Die Fig. 14, 15 und 16 zeigen Draufsichten unterschiedlicher Ausführungsformen eines Mesoscale-Filters 24, der im Durchflußkanal 20 in einer Analysevorrichtung 10 mikrofertigt ist.

Fig. 17 ist eine schematische perspektivische Ansicht eines Geräts 60, das in Kombination mit der Vorrichtung 10 zum Betrachten des Inhalts der Vorrichtung verwendet wird.

Fig. 18 ist eine schematische Querschnittsansicht des Geräts 60 aus Fig. 17.

Gleiche Bezugszeichen stehen in den Abbildungen jeweils für entsprechende Teile.

#### Ausführliche Beschreibung

Die Erfindung bietet eine Gruppe kleiner, massengefertiger, typischerweise nur einmal verwendbarer Vorrichtungen zur Durchführung einer Polynukleotid-Polymerisationsreaktion, die eine rasche Amplifizierung eines Polynukleotids in einer Flüssigkeitsprobe ermöglicht. Die Vorrichtungen umfassen ein festes Substrat, das typischerweise eine Dicke in der Größenordnung einiger weniger Millimeter und eine Fläche von etwa 0,2 bis 2,0 cm<sup>2</sup> aufweist und mikrofertigert ist, um eine Probeneinlaßöffnung und ein Mesoscale-Durchflußsystem zu definieren. Das Mesoscale-Durchflußsystem umfaßt zumindest einen Probendurchflußkanal, der sich von der Einlaßöffnung weg erstreckt, und zumindest eine Polynukleotid-Polymerisationsreaktionskammer in Fluidkommunikation mit dem Durchflußkanal. Die Anordnung von Kanälen, Kammern und der Vielzahl an Öffnungen erleichtert die nacheinander erfolgende, zeitlich abgestimmte und volumetrisch korrekte Zufuhr von Probe und Reagenzien innerhalb der Vorrichtung. Die Reaktionskammer und die Durchflußkanäle besitzen vorzugsweise eine Mesoscale-Dimension, z.B. eine Querschnittsdimension in der Größenordnung von 0,1-500 µm. Die bevorzugte Tiefe der Reaktionskammer liegt in der Größenordnung von 0,7-100 µm, die bevorzugte Breite bei 2,0-500 µm. Die bevorzugte Tiefe der Durchflußkanäle liegt in der Größenordnung von 0,1-100 µm, die bevorzugte Breite bei 2,0-200 µm.

In einer Ausführungsform können die Vorrichtungen zur Durchführung von PCR in der PCR-Kammer verwendet werden. Die PCR-Kammer ist mit Reagenzien versehen, die zur PCR erforderlich sind, z.B. mit dem Proben-Polynukleotid, einer Polymerase wie etwa

Taq-Polymerase, Nukleosidtriphosphaten, einem ersten, mit dem Proben-Polynukleotid hybridisierbaren Primer und einem zweiten, mit einer Sequenz hybridisierbaren Primer, die zum Polynukleotid komplementär ist, worin der erste und der zweite Primer die Termini des polymerisierten Polynukleotid-Produkts definieren. Die PCR kann gemäß auf dem Gebiet bekannter Verfahren (Maniatis et al., s.o.) durchgeführt werden. Die Vorrichtung kann ein Mittel zur zyklischen thermischen Behandlung des Inhalts der Kammer enthalten, sodaß in jedem Zyklus die Temperatur gesteuert wird, um doppelstrangiges Polynukleotid zu dehybridisieren und einstrangiges Polynukleotid zu produzieren, und die Primer anneliert werden und Polynukleotid-Polymerisation erfolgen kann. Außerdem können andere auf dem Gebiet bekannte Polynukleotid-Polymerisationsreaktionen eingesetzt werden, z.B. die isotherme *in vitro*-Amplifizierung von DNA durch ein Restriktionsenzym/DNA-Polymerase-System. Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 392-396 (1992). Eine Ligase-Kettenreaktion kommt ebenfalls in Frage. Backman, K. Clin. Chem. 38, 457-458 (1992).

In einer Ausführungsform kann die Vorrichtung auch ein Mittel zum Detektieren des amplifizierten Polynukleotids enthalten. Die Vorrichtungen können zur Durchführung einer Reihe automatisierter, sensitiver und rascher Polynukleotid-Analysen herangezogen werden, z.B. zur Analyse von Polynukleotiden in Zellen oder in Lösung. Bei Abschluß des Assay werden die Vorrichtungen typischerweise entsorgt. Die Verwendung von Einwegvorrichtungen verhindert die Kontamination der Proben. Die Probe und das Reaktionsgemisch können zu jedem Zeitpunkt eingeschlossen bleiben, und das geringe Volumen vereinfacht die Abfallentsorgung.

Analysevorrichtungen mit Mesoscale-Durchflußkanälen und Reaktionskammern können in großen Mengen aus einem festen Substratmaterial konstruiert und gefertigt werden. Sie lassen sich leicht sterilisieren. Silizium ist aufgrund fortschrittlicher Technologien zu seiner präzisen und effizienten Herstellung bevorzugt, doch auch andere Materialien können verwendet werden, z.B. Polymere von Polytetrafluorethylenen. Der Probeneinlaß und andere Öffnungen, das Mesoscale-Durchflußsystem, einschließlich des oder der

Probendurchflußkanäle und der Reaktionskammer(n) und anderer funktioneller Elemente, können somit kostengünstig in großen Mengen aus einem Siliziumsubstrat gefertigt werden, wobei dabei beliebige, den Fachleuten auf dem Gebiet bekannte Mikro-Materialbearbeitungsverfahren zum Einsatz kommen. Dazu zählen Filmablagerungsverfahren wie z.B. Rotationsbeschichtung und chemische Dampfabscheidung, Laserherstellung und photolithographische Verfahren, wie z.B. UV- oder Röntgenstrahlenprozesse, oder Ätzverfahren, die entweder durch chemische Naßverfahren oder Plasmaprozesse durchgeführt werden können (siehe z.B. Mänz et al., Trends in Analytical Chemistry 10, 144-149 (1991)).

Durchflußkanäle unterschiedlicher Breite und Tiefe können in Mesoscale-Dimensionen gefertigt werden. Das Siliziumsubstrat, das einen gefertigten Mesoscale-Durchflußkanal enthält, kann mit einer dünnen, anodisch gebundenen Glasabdeckung abgedeckt und abgedichtet sein. Andere durchsichtige oder trübe Abdeckmaterialien kommen ebenfalls in Frage. Die Verwendung einer durchsichtigen Abdeckung liefert ein Fenster, das die dynamische Betrachtung des Inhalts im Mesoscale-Durchflußsystem erleichtert. Andere Herstellungsverfahren sind auch möglich.

In einer Ausführungsform kann eine PCR-Analyse in der Reaktionskammer der Vorrichtungen durchgeführt werden. Wie schematisch in den Fig. 1 und 2 dargestellt, kann die Vorrichtung 10 ein Siliziumsubstrat 14 umfassen, das mit Einlaßöffnungen 16, einem Mesoscale-Durchflußkanal 20 und einer PCR-Kammer 22 mikrofabriziert ist. Die Polynukleotid-Probe und die zur Polymerisationsreaktion erforderlichen Reagenzien werden zugegeben und die Produkte - falls erforderlich - über den Durchflußkanal 20 und die Reaktionskammer 22 durch die Einlaßöffnungen 16 abgezogen, die an beiden Enden des Durchflußkanals 20 ausgebildet sind. Das Substrat 14 ist mit einer Glas- oder Kunststoffabdeckung 12 abgedeckt. Während der Analyse kann die Vorrichtung 10 in Kombination mit einem Gerät verwendet werden, wie z.B. dem schematisch in Fig. 3A gezeigten Gerät 50. Das Gerät 50 enthält eine Aufnahmestelle 58 zum Halten der Vorrichtung 10 und zum Ausrichten der Öffnungen, z.B. der Öffnungen 16 auf der Vorrichtung 10,

mit einer Strömungsleitung 56 im Gerät. Eine Pumpe 52 im Gerät 50 dient dazu, Probe und/oder Reagenzien von der Strömungsleitung 56 im Gerät über die Einlaßöffnungen 16 zur Reaktionskammer 22 zu befördern.

Das Gerät 50 kann ein Heiz/Kühl-Element 57 zum Steuern der Temperatur in der PCR-Kammer, z.B. ein elektrisches Heizelement und/oder eine Kühlspirale, enthalten. Das elektrische Heizelement kann alternativ dazu in das Substrat 10 integriert sein, wobei Stromkontakte mit elektrischen Kontakten im Gerät unterhalb der Reaktionskammer 22 zusammenpassen. Alternativ dazu kann das Gerät, wie aus Fig. 3B ersichtlich, ein Heizmittel 53, wie z.B. einen Laser oder eine andere Quelle elektromagnetischer Energie, enthalten, die über der Reaktionskammer in der Vorrichtung 10 angeordnet ist. Alternativ dazu kann der Laser im Gerät unterhalb der Reaktionskammer positioniert sein. Ein Mikroprozessor im Gerät kann dazu dienen, das Heizelement zu steuern und einen Temperaturzyklus in der PCR-Kammer zwischen einer zur Dehybridisierung erforderlichen Temperatur, z.B. 94°C, und einer zum Annelieren und Polymerisieren geeigneten Temperatur, z.B. 65°C, zu ermöglichen. Es kann auch ein Thermoelement im Substrat in elektrischem Kontakt mit dem Gerät vorgesehen sein, sodaß der Mikroprozessor Temperaturzyklen in der Reaktionskammer detektiert und aufrechterhält. Ein Kühllement, z.B. eine thermoelektrische Miniatur-Wärmepumpe (Materials Electronic Products Corporation, Trenton, New Jersey, USA), kann auch im Gerät vorhanden sein, um die Temperatur der Reaktionskammer einzustellen. In einer weiteren Ausführungsform (dem in Fig. 3B gezeigten Gerät) kann die Temperatur der Reaktionskammer durch einen zeitlich abgestimmten Laserpuls reguliert werden, der durch die Glasabdeckung 12 auf die Reaktionskammer gerichtet ist, um die Probe hintereinander auf die für den PCR-Zyklus erforderlichen Temperaturen zu erhitzen und abzukühlen. Die Wärmeeigenschaften von Silizium sorgen für einen raschen Heiz- und Kühlzyklus.

Die Analysevorrichtungen können auch in Kombination mit einem Gerät zum Betrachten des Inhalts der Mesoscale-Kanäle in den Vorrichtungen verwendet werden. Das Gerät kann in einer Ausführungsform ein Mikroskop zum Betrachten des Inhalts der Meso-

scale-Kanäle in den Vorrichtungen umfassen. In einer weiteren Ausführungsform kann eine Kamera im Gerät enthalten sein, wie dies aus dem schematisch in den Fig. 17 und 18 dargestellten Gerät 60 ersichtlich ist. Das Gerät 60 ist mit einem Gehäuse 62, einem Sichtschirm 64 und einem Schlitz 66 zum Einschieben eines Chips in das Gerät ausgestattet. Wie aus dem Querschnitt in Fig. 17 ersichtlich, enthält das Gerät 60 auch eine Videokamera 68, ein optisches System 70 und einen Kippmechanismus 72 zum Halten der Vorrichtung 10 und zur händischen Einstellung der Position und des Winkels der Vorrichtung 10. Das optische System 70 kann ein Linsensystem zur Vergrößerung des Kanalinhals sowie als Lichtquelle enthalten. Die Videokamera 68 und der Schirm 64 ermöglichen, daß Änderungen der Eigenschaften der Probenflüssigkeit, z.B. Strömungseigenschaften oder Farbe, die durch die Gegenwart von polymerisiertem Polynukleotid hervorgerufen werden, visuell überwacht und gegebenenfalls unter Verwendung des Geräts aufgezeichnet werden.

In einer weiteren schematisch in den Fig. 4, 5 und 6A dargestellten Ausführungsform kann eine Mesoscale-PCR-Kammer mit mehreren Abschnitten mikrofertigt sein; z.B. zwei über den Durchflußkanal 20B verbundenen Abschnitten 22A und 22B. In dieser Ausführungsform wird der Abschnitt 22A auf eine zur Dehybridisierung geeignete Temperatur erhitzt und der Abschnitt 22B auf eine zum Annelieren und Polymerisieren geeignete Temperatur erhitzt. Während einer Analyse kann die Vorrichtung 10 im Gerät 50 untergebracht sein (Fig. 6A). Das Gerät 50 ist mit einem Mittel 57 zur Steuerung der Temperatur der Reaktionskammerabschnitte ausgestattet. Alternativ dazu kann ein Laser zum Erhitzen der Abschnitte verwendet werden. Ein Thermoelement kann im Substrat enthalten sein, um die Temperaturwerte der Abschnitte der Reaktionskammer zu überwachen, wobei seine Leistung dazu dienen kann, die zugeführte Wärme mittels eines Mikroprozessors zu steuern. Beim Betrieb wird eine Pumpe 52 im Gerät dazu verwendet, die Polynukleotid-Probe und die erforderlichen PCR-Reagenzien aus der Strömungsleitung 56 durch die Einlaßöffnung 16A zum Abschnitt 22A zu lenken. Die Pumpe 52, die auch durch einen Mikroprozessor im Gerät gesteuert werden kann, dient dann dazu, die Probe kontinuierlich zwischen den Abschnitten 22A und 22B durch den Kanal zu

zyklieren, um einen kontinuierlichen PCR-Zyklus durchzuführen, während die Öffnung 16B als Entlüftung dient. Wenn die Reaktion abgeschlossen ist, kann die Pumpe 52 im Gerät 50 dazu dienen, die Probe durch die Öffnung 16B und die Leitung 56 im Gerät zur Öffnung 59 zu leiten, sodaß das Produkt gewonnen wird. Natürlich kann man drei oder mehr Kammern verwenden, von denen jede bei einer zur Durchführung einer bestimmten Reaktion geeigneten Temperatur gehalten wird.

In einer weiteren Ausführungsform, der in den Fig. 4, 5 und 6B gezeigten Vorrichtung 10, kann ein Heizelement zum Erhitzen des Abschnitts 22A auf eine zur Dehybridisierung doppelstrangiger DNA geeignete Temperatur, z.B. 94°C, verwendet werden, während Abschnitt 22B und Kanal 20B, der die Abschnitte 22A und 22B miteinander verbindet, solcherart von Abschnitt 22B beabstandet sind, daß beim Transport einer erhitzten Probe von Abschnitt 22A zu Abschnitt 22B Wärme ausreichend verteilt wird, sodaß die Temperatur der Probe auf einen Wert fällt, der zum Annelieren und Polymerisieren erforderlich ist, bevor die Probe zur weiteren zyklischen thermischen Behandlung zu Abschnitt 22A zurückkehrt. Dies kann problemlos erreicht werden, da Silizium eine relativ hohe Wärmeleitfähigkeit besitzt und die Grenzfläche zwischen der Flüssigkeitsprobe und dem Substrat recht groß ist. In dieser Ausführungsform dienen Mikroprozessoren im Gerät 50 zur Steuerung der Pumpe 52, die den Durchflußzyklus der Probe zwischen den Abschnitten 22A und 22B reguliert. Somit schafft ein dynamisches Wärmegleichgewicht einen Temperaturgradienten entlang des Strömungswegs zwischen den Kammern, und es werden geeignete Temperaturwerte in beiden Kammern unter Verwendung einer einzigen Heizquelle erzielt. Andere Konstruktionen sind auch möglich. Beispielsweise könnten die Annelier- und Polymerisationsreaktionen in unterschiedlichen Abschnitten einer einzelnen PCR-Kammer, die auf unterschiedliche optimierte Temperaturen eingestellt sind, durchgeführt werden.

Die PCR kann unter Verwendung jeder wärmestabilen Polynukleotid-Polymerase, z.B. Taq-Polymerase, durchgeführt werden. Reagenzien wie z.B. Taq-Polymerase können der Probe zugegeben und dann durch eine Einlaßöffnung der Mesoscale-Reaktionskammer

zugeleitet werden; Reagenzien können der Reaktionskammer auch unabhängig von der Probe durch eine getrennte Einlaßöffnung zugeführt werden.

Die Aufnahmefähigkeit der Vorrichtungen ist sehr klein, weshalb die für eine Analyse erforderliche Menge an Probeflüssigkeit auch klein ist. Beispielsweise ist in einem 1 x 1 cm großen Siliziumsubstrat mit einer Anordnung von 500 Rillen auf seiner Oberfläche, die  $10 \mu\text{m}$  breit  $\times 10 \mu\text{m}$  tief  $\times 1 \text{ cm}$  ( $10^4 \mu\text{m}$ ) lang sind, das Volumen jeder Rille  $10^{-3} \mu\text{l}$  und das Gesamtvolumen der 500 Rillen  $0,5 \mu\text{l}$ . Das geringe Volumen der Mesoscale-Durchflußsysteme ermöglicht die Durchführung von Assays mit sehr geringen Mengen einer Flüssigkeitsprobe ( $< 5 \mu\text{l}$ ). Die Mesoscale-Durchflußsysteme der Vorrichtungen können mit Mikrolitervolumina oder alternativ mit Nanolitervolumina oder weniger mikrofertigertigt sein, was die Menge der Probe und/oder Reagenzflüssigkeiten, die für einen Assay erforderlich sind, günstigerweise einschränkt.

Die Vorrichtungen der Erfindung besitzen Mesoscale-Polynukleotid-Polymerisationsreaktionskammern, die zur raschen Amplifizierung eines Polynukleotids in einer biologischen flüssigen Probe verwendet werden können. Die Vorrichtung kann auch ein Mittel zum Detektieren des amplifizierten Polynukleotid-Produkts enthalten, das sich entweder im Substrat oder im Gerät befindet. Die Gegenwart von amplifiziertem Polynukleotid-Produkt in der Vorrichtung kann durch ein beliebiges Verfahren detektiert werden, z.B. Überwachen des Drucks oder der elektrischen Leitfähigkeit von Flüssigkeitsproben, die in die Reaktionskammer des Mesoscale-Durchflußsystems eintreten und/oder aus diesem gelangen. Die Gegenwart von amplifiziertem Polynukleotid-Produkt kann auch durch einen Bindeassay mit einer markierten Sonde, wie z.B. einer markierten Oligonukleotid- oder Antikörpersonde, oder durch Gelelektrophorese detektiert werden.

In einer Ausführungsform kann das amplifizierte Polynukleotid-Produkt durch Verwendung einer Detektionskammer detektiert werden, die im Mesoscale-Durchflußsystem im Substrat in Fluidkommunikation mit der Reaktionskammer ausgebildet ist. Die Detek-

tionskammer ist mit einer Bindegruppe versehen, die sich an das amplifizierte Polynukleotid bindet. Die Bindegruppe kann z.B. eine Polynukleotid- oder Antikörpersonde umfassen. Die Detektionskammer kann gemäß Verfahren gebildet werden, die in der am 1. Mai 1992 eingereichten US-Anmeldung mit der Seriennummer 07/877.702 geoffenbart sind (entspricht der WO 93/22053 vom 11. November 1993), wobei diese Offenbarung hierin durch Verweis aufgenommen ist. Die Vorrichtung kann in Kombination mit einem Gerät verwendet werden, das einen Mikroprozessor zum Detektieren und Aufzeichnen von während eines Assays erfaßten Daten enthält.

In einer Ausführungsform kann die Mesoscale-Detektionskammer ein inertes Substrat, z.B. eine Perle oder ein anderes Teilchen, aufweisen, das sich an polymerisiertes Polynukleotid binden kann, um eine detektierbare Agglomeration der Perlen in Gegenwart von polymerisiertem Polynukleotid-Produkt herbeizuführen. Durch Teilchen bewirkte Agglomeration kann durch Anbringen einer Bindegruppe, wie z.B. eines Antikörpers, am Teilchen verstärkt werden.

Antikörper oder andere Bindegruppen, die sich an das polymerisierte Polynukleotid binden können, können in die Detektionskammer eingebracht oder - entweder chemisch oder durch Absorption - auf die Oberfläche des Detektionsbereich, oder alternativ dazu auf die Oberfläche eines inerten Teilchens im Detektionsbereich aufgetragen werden, um die Bindung herbeizuführen, was einen positiven Test für das Polynukleotid ergibt. Verfahren zur chemischen Aktivierung von siliziumhaltigen Oberflächen sind auf dem Gebiet bekannt, besonders im Zusammenhang mit Chromatographie. Siehe z.B. Haller in: Solid Phase Biochemistry, W.H. Scouten (Hrsg.), John Wiley, New York, S. 535-597 (1983); und Mandenius et al., Anal. Biochem. 170, 68-72 (1988). In einer Ausführungsform kann die Bindegruppe einen Antikörper umfassen, und auf dem Gebiet bekannte Immunassayverfahren können im Detektionsbereich durchgeführt werden. Siehe z.B. Bolton et al., Handbook of Experimental Immunology, Weir D.M. (Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, Oxford 1986, Bd. 1, Kapitel 26, wo ein allgemeiner Überblick über Immunassays gegeben wird.

Ein optisch detektierbarer Marker wie z.B. ein fluoreszierendes Molekül oder eine fluoreszierende Perle kann an der Bindegruppe angebracht werden, um die Detektion des polymerisierten Polynukleotids zu verstärken. Alternativ dazu kann eine zweite markierte Substanz, z.B. ein fluoreszierender markierter Antikörper, durch das Durchflußsystem geleitet werden, um sich an den gebundenen Polynukleotid/Bindegruppen-Komplex im Detektionsbereich zu binden, um einen "Sandwich" einschließlich einer optisch detektierbaren Gruppe zu bilden, die die Gegenwart des Analyten anzeigt. Die Bindung des amplifizierten Polynukleotids an der Bindegruppe im Detektionsbereich kann z.B. optisch - entweder visuell oder maschinell - durch ein durchsichtiges Fenster detektiert werden, das sich oberhalb des Detektionsbereichs befindet. In einer Ausführungsform kann die Produktion von amplifiziertem Polynukleotid durch Zugabe eines Farbstoffs, wie z.B. Ethidiumbromid, detektiert werden, der beim Binden an doppelstrangiges Polynukleotid verstärkte Fluoreszenz zeigt. Higuchi et al., Biotechnology 10, 413 (1992).

Die Detektionskammer kann auch ein markiertes komplementäres Polynukleotid aufweisen, das sich an einen der Stränge des amplifizierten Polynukleotids binden kann, z.B. ein markiertes, auf einer Perle immobilisiertes Polynukleotid, um die Detektion von polymerisiertem Polynukleotid-Produkt mittels Perlenagglutination zu ermöglichen. Auf dem Gebiet bekannte Polynukleotid-Hybridisierungsverfahren können eingesetzt werden. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Press (1989); Vener et al., Anal. Chem. 198, 308-311 (1991). Polynukleotidsonden können z.B. an ein Latexteilchen im Submikronenbereich befestigt werden. Wolf et al., Nucleic Acids Research 15, 2911-2916 (1987).

Die Polynukleotid-Polymerisation kann auch unter Verwendung eines Detektionsbereichs detektiert werden, der gegenüber der Strömungseinschränkung aufgrund der Gegenwart von polymerisiertem Polynukleotid, das in der Reaktionskammer produziert wird, sensitiv ist: siehe die US-Anmeldung mit der Seriennummer 97/877.536 vom 1.

Mai 1992 (entspricht der WO 93/22055 vom 11. November 1993), Analysis Based on Flow Restriction, deren Offenbarung hierin durch Verweis aufgenommen ist. Die Gegenwart von amplifiziertem Polynukleotid kann auch durch Messen des Drucks oder der elektrischen Leitfähigkeit der in das Durchflußsystem eindringenden und aus diesem gelangenden flüssigen Proben detektiert werden, z.B. mittels elektrischer Kontakte, die sich durch das Substrat hindurch erstrecken und mit elektrischen Kontakten in einem Gerät zusammenpassen, das in Kombination mit der Vorrichtung verwendet wird. Elektrische Kontakte können nach den bekannten Verfahren des Wärmegradienten-Zoneschmelzens gebildet werden. Siehe Zemel et al., in: Fundamentals and Applications of Chemical Sensors, D. Schuetzle und R. Hammerle (Hrsg.), ACS Symposium Series 309, Washington, DC, USA, 1986, S. 2.

Amplifiziertes Polynukleotid in der Reaktionskammer kann durch Überwachen des Drucks des flüssigen Proben detektiert werden. Beispielsweise ermöglichen in einer im Gerät 50 aufgenommenen Vorrichtung 10 (schematische Darstellung in Fig. 6A) die Druckdetektoren 54, die mit den flüssigen Proben, die in das Mesoscale-Durchflußsystem eindringen und aus diesem gelangen, durch Öffnungen 16 verbunden sind, die Detektion von Druckabnahmen infolge der Gegenwart von polymerisiertem Produkt und des resultierenden Verstopfens bzw. der Strömungseinschränkung. Ein Mesoscale-Drucksensor kann auch direkt auf dem Siliziumsubstrat ausgebildet werden. Angell et al., Scientific American 248, 44-55 (1983).

Polynukleotid-Polymerisation kann durch Verwendung eines Mesoscale-Durchflußsystems detektiert werden, das gegenüber Strömungseinschränkung sensitiv ist und ein "fraktales" Muster aufweist, d.h. ein Muster einer Reihe abzweigender Durchflußkanäle. Die fraktal abzweigenden Kanäle können auf einem Siliziumsubstrat mit verringerten Dimensionen an jeder Abzweigung ausgebildet sein, wodurch immer schmälere Durchflußkanäle entstehen. Fig. 7 zeigt eine schematische Draufsicht eines Substrats 14, das mit einem fraktal abzweigenden System von Durchflußkanälen 40 versehen ist, die über den Kanal 20 mit den Öffnungen 16 und einer PCR-Reaktionskammer verbunden sind,

welche die Abschnitte 22A und 22B umfaßt. Die Gegenwart von amplifiziertem Polynukleotid-Produkt in einer Probe beeinflußt die Strömungseigenschaften innerhalb des Fraktals. Die Kanäle 40 sind in dieser Ausführungsform symmetrisch angeordnet und besitzen hin zum Mittelpunkt des Fraktals einen immer engeren Durchmesser. Die Strömung durch dieses Fraktal ist gegenüber Veränderungen der Flüssigkeitsviskosität infolge der Gegenwart von polymerisiertem Produkt sensitiv. Alternativ dazu kann ein komplexeres Fraktal-Durchflußsystem verwendet werden, wie es in Fig. 13 veranschaulicht ist. Fig. 13 zeigt ein Paar fraktal abzweigender Durchflußkanäle 40A und 40B. Der Fraktal-Durchflußkanal 40A ist mit Durchflußkanälen versehen, die hin zum Mittelpunkt des Fraktals immer enger werden, wodurch sich eine verstärkte Sensitivität gegenüber Strömungseinschränkung ergibt.

Die Strömungseinschränkung im Fraktalbereich kann z.B. optisch durch eine durchsichtige Abdeckung oberhalb des Detektionsbereichs detektiert werden. Alternativ dazu können einer oder mehrere Drucksensoren verwendet werden, um Druckveränderungen infolge von Änderungen der Flüssigkeitseigenschaften aufgrund der Gegenwart von amplifiziertem Polynukleotid in oder über die Fraktal-Strömungswägen hinausgehend zu detektieren. Veränderungen der Leitfähigkeit durch Produktion von Polynukleotid kann ebenfalls problemlos detektiert werden; dies erfolgt durch elektrische Leitfähigkeitssensoren, die mit dem Durchflußbereich in Kontakt stehen. Die Verstopfung des Fraktalbereichs 40, die den Durchfluß von der Einlaßöffnung 16A zur Auslaßöffnung 16B blockiert, könnte durch eine herkömmliche Leitfähigkeitssonde 17 detektiert werden, deren Ausgangssignal ein Indikator für die Gegenwart oder Abwesenheit von wäßriger Flüssigkeit im Ausflußkanal ist. Bindegruppen, wie z.B. markierte Antikörper oder Polynukleotidsonden, können im Fraktalbereich enthalten sein (z.B. immobilisiert) oder sich auf einem Festphasenreagens wie z.B. einer Perle befinden, um sich an das Polynukleotid-Produkt zu binden und eine Strömungseinschränkung im Fraktal-Strömungsweg herbeizuführen.

In einer Ausführungsform enthält das Mesoscale-Durchflußsystem eine Kammer zum Lysieren von Zellen aus einer Probe als Vorbereitung auf eine stromab durchgeführte Polynukleotidanalyse. Die Vorrichtungen können auch einen Bereich enthalten, der ausgebildet ist, einen bestimmten Zelltyp in einer heterogenen Zellpopulation abzutrennen. Der Zelltrennbereich enthält immobilisierte Bindegruppen, die auf Strukturen im Substrat immobilisiert sind, das sich über ein charakteristisches Zelloberflächenmolekül, wie z.B. ein Protein, selektiv reversibel an eine Zielzelle bindet. Andere Zellen in der Probe bewegen sich stromabwärts und werden in ein Sammelbecken oder über eine Auslaßöffnung abgegeben. Der Fluß kann zum Auswaschen der Zellen, z.B. mit einem Pufferstrom, fortgesetzt werden. Bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten und Drücken werden die gewaschenen Zellen von den Oberflächen durch Scherung abgelöst und aus dem Trennbereich freigesetzt und bewegen sich stromabwärts zu Lysemitteln, die die Zellen vor der PCR-Analyse eines intrazellulären RNA- oder DNA-Moleküls lysieren.

Das Zell-Lysemittel ist typischerweise im Strömungsweg zwischen dem Zelltrennbereich (sofern ein solcher vorhanden ist) und der Polynukleotid-Polymerisationsreaktionskammer angeordnet, um das Lysieren der Zellen vor der Analyse auf intrazelluläres Polynukleotid zu ermöglichen. Wie aus Fig. 9 ersichtlich, kann das Zell-Lysemittel zellmembran-durchbohrende Vorsprünge 90 umfassen, die sich von einer Oberfläche eines Durchflußkanals 20 weg erstrecken. Wenn die Flüssigkeitsströmung durch den durchbohrenden Vorsprung 90 gedrängt wird, werden die Zellen aufgebrochen. In einer weiteren Ausführungsform kann das Zell-Lysemittel einfach einen Bereich mit eingeschränkter Querschnittsdimension umfassen, der bei Ausübung eines ausreichenden Strömungsdrucks die Zell-Lyse durchführt. Das Zell-Lysemittel kann auch scharfkantige Siliziumstücke umfassen, die innerhalb einer Mesoscale-Lysekammer eingeschlossen sind. Ein Gerät, das ein Mittel zum Drängen der zellenhältigen Probe in das Zell-Lysemittel umfaßt, z.B. eine Pumpe, bewirkt bei Ausübung eines ausreichenden Strömungsdrucks Zell-Lyse und befördert anschließend die Probe durch das Durchflußsystem zur Reaktionskammer. In einer weiteren Ausführungsform kann das Zell-Lysemittel eine Substanz

zur Zell-Lyse umfassen. Auf dem Gebiet bekannte Substanzen zur Zell-Lyse können verwendet werden.

Reagenzien können der Reaktionskammer über eine getrennte Einlaßöffnung im Substrat in Fluidkommunikation mit der Reaktionskammer zugegeben werden. Ein im Durchflußkanal auf dem Siliziumsubstrat mikrofabrizierter Filter kann dazu dienen, Zellbruchstücke vor der Polynukleotidanalyse zu filtern. In einer Ausführungsform (dargestellt in den Fig. 14, 15 und 16) kann der Filter 24 in der Vorrichtung 10 einen Mesoscale-Durchflußkanal von geringerem Durchmesser als der Kanal 20 umfassen. Während des Betriebs fließt die Probe vom Probendurchflußkanal 20A durch den Filter 24. Das Probenfiltrat tritt dann aus dem Filter 24 aus und fließt durch den Kanal 20B. Der Filter ist mit Tiefen und Breiten in der Größenordnung von 0-1 bis 10  $\mu\text{m}$  mikrofabriziert, während die Durchflußkanäle 20A und 20B maximale Tiefen und Breiten in der Größenordnung von etwa 500  $\mu\text{m}$  aufweisen. Wie aus Fig. 8 ersichtlich, kann die Oberfläche eines Durchflußkanals 20 auch Vorsprünge 80 aufweisen, die ein Zell-Sieb zur Größentrennung von Zellen stromauf von der PCR-Analysekammer darstellen. Wenn Zellproben durch den Durchflußkanal strömen (typischerweise bei geringem Druck), erreichen nur Zellen, die klein genug sind, um zwischen den Vorsprüngen 80 hindurchzuströmen, die stromabwärtigen funktionellen Elemente. Diese Zellen können anschließend durch einen Zell-Lysebereich und dann zwecks Analyse zu einer PCR-Reaktionskammer geleitet werden.

In einer weiteren Ausführungsform können paramagnetische oder ferromagnetische Perlen im Mesoscale-Durchflußsystem vorhanden sein; sie werden durch ein äußeres Magnetfeld, das sich z.B. im Gerät befindet, entlang des Durchflußsystems bewegt werden. Die Perlen können zum Transport von Reagenzien zwischen funktionellen Elementen in der Vorrichtung oder zur Verschiebung einer Probe, eines Reagens oder eines Reaktionsgemisches verwendet werden. In einer Ausführungsform kann eine Polynukleotidsonde auf den magnetischen Perlen immobilisiert sein, sodaß sich die Perlen an amplifiziertes Polynukleotid binden können. Magnetische Perlen, die eine Beschichtung einer

Polynukleotidsonde umfassen, können am Ende eines Assays durch das Durchflußsystem zur Reaktionskammer befördert werden, um sich an das polymerisierte Polynukleotid-Produkt zu binden. Das gebundene polymerisierte Polynukleotid kann dann auf den magnetischen Perlen zu einer Detektions- oder Reinigungskammer im Durchflußsystem oder zu einer Sammelöffnung transportiert werden.

Eine in Fig. 10 dargestellte Ausführungsform der Erfindung ist eine Vorrichtung 10, umfassend ein Substrat 14, das mit einer Mesoscale-PCR-Kammer mikrofertigt ist, die die Abschnitte 22A und 22B umfaßt, die über den Strömungsweg 20B miteinander verbunden sind. Der PCR-Chip 10 wird in Kombination mit einem Gerät wie z.B. dem Gerät 50 aus Fig. 6A eingesetzt, das eine Aufnahmestelle zum Halten des Chips aufweist. Das Gerät 50 ist mit Strömungswegen 56 versehen, die an die Öffnungen 16A, 16B, 16C und 16D in der Vorrichtung 10 angepaßt sind. Das Gerät umfaßt auch Ventile, die das mechanische Öffnen und Schließen der Öffnungen 16A, 16B, 16C und 16D ermöglichen. In einer Ausführungsform können die Durchflußsysteme der Vorrichtungen bei einem hydraulisch vollen Volumen gehalten und die Ventile im Gerät oder - alternativ dazu - in den Vorrichtungen eingesetzt werden, um die Flüssigkeitsströmung zu lenken. Die Abschnitte 22A und 22B der PCR-Kammer werden auf 94°C bzw. 65°C erhitzt, um eine für PCR notwendige Schmelztemperatur und Anneliertemperatur zu erreichen. Wie oben besprochen, können Reaktionskammerabschnitte mittels eines elektrischen Kontakts erhitzt werden, der im Substrat unterhalb der Abschnitte integriert ist und mit elektrischen Kontakten im Gerät zusammenpassen kann. Alternativ dazu kann ein optischer Laser dazu dienen, die Reaktionskammerabschnitte durch eine über dem Substrat angeordnete Glasabdeckung hindurch zu erhitzen. Ein Wärmesensor kann im Substrat angeordnet und in elektrischem Kontakt mit dem Gerät stehen. Ein Mikroprozessor im Gerät kann dazu dienen, die Temperatur der Reaktionskammerabschnitte und die Flüssigkeitsströmung im Durchflußsystem zu steuern.

Anfänglich sind während des Betriebs, wenn die Kanäle und die Kammern voll mit Puffer sind, die Öffnungen 16A und 16C offen, während 16B und 16D geschlossen sind.

Eine Pumpe 52 im Gerät liefert die Probenflüssigkeit und gegebenenfalls Reagenzien, die zur PCR erforderlich sind, z.B. Taq-Polymerase, Primer und Nukleosidtriphosphate, über die Öffnung 16A durch den Filter 24 zum Reaktionskammerabschnitt 22A. Die Öffnung 16A wird anschließend geschlossen und 16B geöffnet; die Pumpe 52 im Gerät wird dazu verwendet, Flüssigkeitsströmung in Zyklen durch den Durchflußkanal 20B zwischen dem Abschnitt 22A, wo die Polynukleotid-Dehybridisierung erfolgt, und dem Abschnitt 22B, wo das Annelieren und Polymerisieren stattfindet, hin- und herzubefördern. Die Öffnung 16C kann zur Entlüftung des Systems und gegebenenfalls auch zur Beförderung von Taq-Polymerase, Nukleosidtriphosphaten, Primern und anderen Reagenzien verwendet werden. Wenn die zyklische Polymerase-Behandlung abgeschlossen ist, z.B. nach 30-35 Zyklen, wird die Öffnung 16C geschlossen, die Öffnung 16D geöffnet und die Pumpe im Gerät in Gang gesetzt, um die Reaktionsprodukte aus den PCR-Kammerabschnitten 22A und 22B zur Detektionskammer 22C zu leiten, die z.B. ein Polynukleotid enthält, das zum amplifizierten sense- und/oder antisense-Strang (auf Perlen 92 immobilisiert) komplementär ist. Das Polymerisationsprodukt wird durch Beobachtung der Agglutination der Perlen 92 detektiert, z.B. visuell durch eine über dem Detektionsbereich angeordnete durchsichtige Abdeckung.

Eine weitere Ausführungsform ist in Fig. 11 veranschaulicht. Die Funktion, die Struktur und der Betrieb dieser Vorrichtung sind identisch zur Vorrichtung aus Fig. 10, außer daß sie eine einzige PCR-Reaktionskammer 22A umfaßt. Die Vorrichtung wird in Kombination mit einem Gerät, wie z.B. dem in Fig. 3A gezeigten Gerät, verwendet. Die Vorrichtung enthält ein Mittel zum Erhitzen und Abkühlen der Reaktionskammer 22A auf eine zum Schmelzen erforderliche Temperatur oder eine zum Annelieren und Polymerisieren erforderliche Temperatur.

Während des Betriebs verwendet man das Gerät dazu, eine probehältige Polymerase und andere für PCR notwendige Reagenzien durch die Einlaßöffnung 16A zur Reaktionskammer 22A zu leiten. Die Öffnungen 16A und 16D werden dann unter Verwendung des im Gerät angeschlossenen Ventils geschlossen, während die Öffnungen 16B

und 16C offen bleiben. Das Heizelement im Gerät dient dann zur zyklischen thermischen Behandlung in der Reaktionskammer zwischen einer zur Dehybridisierung erforderlichen Temperatur und einer zum Annelieren und Polymerisieren geeigneten Temperatur. Wenn der PCR-Reaktionszyklus abgeschlossen ist, wird die Öffnung 16C geschlossen, die Öffnung 16D geöffnet und die Probe zur Detektionskammer 22B geleitet, die eine z.B. auf Perlen 92 immobilisierte Polynukleotidsonde enthält. Ein positiver Assay auf das Polynukleotid wird durch Agglutination der Polynukleotidsonde in der Detektionskammer angezeigt:

Es folgt eine Beschreibung der Erfindung anhand der nachstehenden, nicht einschränkenden Beispiele.

#### Beispiel 1

Eine PCR wird in der schematisch in Fig. 11 dargestellten Vorrichtung durchgeführt. Um eine PCR-Analyse zum Detektieren eines Polynukleotids in einer Zelle durchzuführen, wird ein Proben-Zell-Lysat einer gepufferten Lösung von Taq-Polymerase, Nukleosidtriphosphaten, Polynukleotidprimern und anderen für PCR notwendigen Reagenzien zugegeben. Das Proben-Zell-Lysat wird über das Gerät durch die Eingangsöffnung 16A hindurch in die PCR-Reaktionskammer 22A geleitet. Die Öffnungen 16A und 16D werden mittels der im Gerät enthaltenen Ventile geschlossen, während die Ventile 16B und 16C offen sind. Der Mikroprozessor und das Temperatursteuerelement im Gerät dienen zur Durchführung eines Temperaturzyklus in der Reaktionskammer 22A zwischen 94°C (für Polynukleotid-Dehybridisierung) und 65°C (für Polymerase-Reaktion). Nach Abschluß der PCR wird die Öffnung 16C geschlossen, 16D geöffnet und die Pumpe im Gerät (mit der Öffnung 16B verbunden) dazu verwendet, die Probe aus der PCR-Reaktionskammer 22A über den Durchflußkanal 20B zur Detektionskammer 22B zu befördern. Die Detektionskammer 22B enthält die Perlen 92, die ein oberflächen-immobilisiertes komplementäres Polynukleotid umfassen, das zur Bindung des amplifizierten Polynukleotids fähig ist. Die Agglutination der Perlen aufgrund der Hybridisierungsreaktion zwischen

dem amplifizierten Polynukleotid und dem komplementären Polynukleotid wird durch ein Fenster oberhalb des Detektionsbereichs 22B beobachtet und bietet einen Test auf die Gegenwart von amplifiziertem Polynukleotid-Produkt.

### Beispiel 2

Fig. 12 ist eine schematische Darstellung einer Vorrichtung 10 einschließlich des Substrats 14, die zur Trennung einer Nukleinsäure von einer Zellen-Subpopulation in einem Gemisch in einer Probe einer biologischen Flüssigkeit und zur anschließenden Durchführung eines Assays auf eine bestimmte Nukleotidsequenz dienen. Der Mesoscale-Strömungsweg 20, der eine Zelltrennkammer 22A, eine Zell-Lysekammer 22B, einen Filterbereich 24, eine PCR-Reaktionskammer mit den Abschnitten 22C und 22D und einen Fraktal-Detektionsbereich 40 enthält, ist auf der Vorrichtung 10 mikrofertig. Das Mesoscale-Durchflußsystem 20 ist auch mit Flüssigkeitseintritts-/austrittsöffnungen 16A, 16B, 16C und 16D ausgestattet. Die Vorrichtung wird in Kombination mit einem Gerät, wie z.B. dem in Fig. 6A gezeigten Gerät, eingesetzt.

Anfänglich werden die Ventile im Gerät dazu verwendet, die Öffnungen 16C und 16D zu schließen, während die Öffnungen 16A und 16B offen sind. Eine Probe, die ein Zellgemisch enthält, wird durch die Pumpe 52 im Gerät zur Probeneinlaßöffnung 16A geleitet und strömt durch den Mesoscale-Strömungsweg 10 zur Trennkammer 22A. Die Kammer 22A enthält an der Wand der Kammer immobilisierte Bindeguppen, die sich selektiv an ein Oberflächenmolekül auf einem gewünschten Zelltyp in der Probe binden. Verbleibende Zellkomponenten treten über die Öffnung 16B aus dem Substrat aus. Nach dem Binden der erwünschten Zellpopulation in der Kammer 22A wird der Durchfluß mit Puffer fortgesetzt, um die Zellpopulation auszuwaschen und ihre Isolation sicherzustellen. Als nächstes wird die Öffnung 16B geschlossen und 16C geöffnet. Der Fluß wird dann ausreichend erhöht, um die immobilisierten Zellen zu bewegen. Der Durchfluß wird fortgesetzt, um die Zellen durch membran durchbohrende Vorsprünge

90 in der Kammer 22B zu drängen, welche die Zellen aufreißen und intrazelluläres Material freisetzen.

Der Probenfluß wird am Filter 24 vorbei fortgesetzt, der große Zellmembran-Komponenten und andere Bruchstücke herausfiltert, und gelangt zum Mesoscale-PCR-Kammerabschnitt 22C, der durch den Durchflußkanal 20B mit dem PCR-Kammerabschnitt 22D verbunden ist. Taq-Polymerase, Primer und andere Reagenzien, die für den PCR-Assay erforderlich sind, werden dem Abschnitt 22D als nächstes durch die Öffnung 16C aus einer Öffnung und zusammenpassendem Strömungsweg im Gerät zugegeben, wodurch die Vermischung der intrazellulären, löslichen Komponenten aus der getrennten Zell-Subpopulation und den PCR-Reagenzien ermöglicht wird. Bei geschlossener Öffnung 16A wird eine über die Öffnung 16B angeschlossene Pumpe im Gerät dazu verwendet, die PCR-Probe und Reagenzien durch den Durchflußkanal 20B zwischen den Abschnitten 22C und 22D (auf 94°C bzw. 65°C eingestellt) zyklisch thermisch zu behandeln, um mehrere Polynukleotidschmelz- und -polymerisationszyklen durchzuführen und das Polynukleotid-Produkt zu amplifizieren. Anschließend werden die Ventile im Gerät zum Schließen der Öffnung 16C und zum Öffnen der Öffnung 16D verwendet. Die an die Öffnung 16B angeschlossene Pumpe im Gerät lenkt das aus der Zellpopulation isolierte amplifizierte Polynukleotid zu einem Detektionsbereich, der aus einer fraktal abzweigenden Reihe von Strömungswegen 40 besteht. Die Strömungseinschränkung im Fraktalbereich 40 dient als positiver Indikator der Gegenwart von amplifiziertem Polynukleotid-Produkt und wird optisch durch eine oberhalb des Detektionsbereichs angeordnete Glasabdeckung detektiert.

27.01.99

93 910 907.0  
EP 0 637 999

31

PATENTANSPRÜCHE

1. Vorrichtung zum Amplifizieren eines vorbestimmten Polynukleotids in einer Probe mittels Durchführung einer Polynukleotid-Amplifizierungsreaktion, wobei die Vorrichtung ein festes Substrat umfaßt, das durch Mikrofabrikation so hergestellt ist, daß es definiert:
  - eine Proben-Einlaßöffnung; und
  - ein Mesoscale-Durchflußsystem, umfassend:
    - einen Probendurchflußkanal, der sich von der Einlaßöffnung weg erstreckt; und
    - eine Polynukleotid-Amplifizierungskammer in Fluidkommunikation mit dem Durchflußkanal, wobei die Kammer Reagenzien zur Amplifizierung eines Polynukleotids enthält und zumindest eine Querschnittsabmessung, Breite oder Tiefe, von etwa 0,1  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$  aufweist; wobei die Vorrichtung eine Probenkapazität von 10  $\mu\text{l}$  oder weniger aufweist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, die weiters Heizmittel zur zyklischen thermischen Behandlung des Inhalts der Kammer umfaßt, wobei die Temperatur in jedem Zyklus so reguliert ist, daß doppelstrangiges Polynukleotid abgetrennt wird und die Amplifizierung des vorbestimmten Polynukleotids ermöglicht wird.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, worin die Reagenzien Reagenzien zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion oder einer Ligase-Kettenreaktion umfassen.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin, wenn die Amplifizierungsreaktion eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist, die Amplifizierungskammer umfaßt: ein vorbestimmtes Polynukleotid, eine Polymerase, Nukleosidtriphosphate, einen ersten Primer, der mit dem Probenpolynukleotid hybridisierbar ist, sowie einen zweiten Primer, der mit einer Nukleinsäuresequenz hybridisierbar ist, die zum Polynukleotid

komplementär ist, worin der erste und der zweite Primer die Termini des Polynukleotid-Produkts der Polymerisationsreaktion definieren.

5. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Amplifizierungskammer umfaßt:

- einen ersten Abschnitt;
- einen zweiten Abschnitt; und
- einen zwischen dem ersten und dem zweiten Abschnitt angeordneten Strömungsweg; und

worin die Vorrichtung weiters umfaßt:

- eine Pumpe zum wiederholten Transportieren des Inhalts des Kammer zwischen zumindest dem ersten und dem zweiten Abschnitt.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, worin Mittel zur zyklischen thermischen Behandlung Mittel zur Regulierung des ersten Abschnitts auf eine Temperatur umfaßt, um doppelsträngiges Polynukleotid abzutrennen; und

worin der zweite Abschnitt und der Strömungsweg so weit vom ersten Abschnitt beabstandet sind, daß die Probe beim Transport des Inhalts der Kammer vom ersten Abschnitt zum zweiten Abschnitt passiv auf eine Temperatur abkühlt, die ausreicht, um ein Annelieren von einsträngigem Polynukleotid und die Amplifizierung des vorbestimmten Polynukleotids zu ermöglichen.

7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, worin das Mittel zur zyklischen thermischen Behandlung ein Mittel zur separaten thermischen Regulierung der Temperatur des ersten und des zweiten Abschnitts oder Mittel zur thermischen Regulierung der Temperatur des ersten Abschnitts umfaßt.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, worin das Mittel zur thermischen Regulierung elektrische Widerstandsmittel oder eine Quelle für elektromagnetische Energie umfaßt.

9. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Substrat weiters eine zweite Öffnung umfaßt, die in Fluidkommunikation mit der Amplifizierungskammer steht.
10. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die weiters Mittel zum Detektieren des amplifizierten Polynukleotids umfaßt.
11. Vorrichtung nach Anspruch 10, worin das Mittel zum Detektieren Mittel zum Detektieren von Widerstand gegen die Strömung von Flüssigkeit im Strömungsdurchgang umfaßt, der durch Polynukleotidaggregation verursacht wird.
12. Vorrichtung nach Anspruch 10, worin das Mittel zum Detektieren des amplifizierten Polynukleotids einen Mesoscale-Detektionsbereich umfaßt, der innerhalb des Substrats in Fluidkommunikation mit der Reaktionskammer angeordnet ist; und  
worin die Vorrichtung weiters Mittel zum Herbeiführen von Strömung durch die Reaktionskammer umfaßt, um das amplifizierte Polynukleotid zum Detektionsbereich zu transportieren.
13. Vorrichtung nach Anspruch 12, worin der Detektionsbereich eine Polynukleotidsonde umfaßt, die zur detektierbaren Bindung an das amplifizierte Polynukleotid fähig ist.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, worin die Polynukleotidsonde auf einer Magnetperle immobilisiert ist.
15. Vorrichtung nach Anspruch 13 oder 14, worin der Detektionsbereich einen Fraktalströmungsbereich umfaßt, der in Fluidkommunikation mit dem Durchflußkanal steht und Gabelungen umfaßt, die zu mehreren sekundären Durchflußkanälen führen.

16. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Probe eine Zellprobe ist, wobei die Vorrichtung weiters umfaßt:

    eine Zell-Lyse-Struktur in Fluidkommunikation mit der Reaktionskammer im Mesoscale-Durchflußsystem zum Lysieren einer Zellprobe; und

    Mittel zum Herbeiführen des Strömens der Probe zur Zell-Lysestruktur und dann zur Reaktionskammer.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, die weiters umfaßt:

    einen Zelltrennbereich stromauf von der Zell-Lysestruktur zur selektiven Bindung einer vorbestimmten Zellpopulation, der Bindungsgruppen umfaßt, die zur Bindung der Zellpopulation fähig sind; und

    Mittel zum Herbeiführen von Strömung innerhalb des Trennbereichs.

18. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das feste Substrat Silizium umfaßt.

19. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die weiters ein Gerät zur Verwendung in Kombination mit dem Substrat umfaßt, wobei das Gerät umfaßt:

    Mittel zum Halten des Substrats; und

    eine Strömungsleitung, die mit einer Einlaßöffnung auf dem Substrat ineinanderpaßt.

20. Vorrichtung nach Anspruch 19, die weiters eine Pumpe umfaßt, um Fluid durch das Durchflußsystem des Substrats hindurchzuleiten, wenn es im Haltemittel gehalten wird.

21. Vorrichtung nach Anspruch 19 oder 20, worin das Gerät weiters ein Reagensreservoir und Mittel zum Abgeben von Reagens an das Durchflußsystem umfaßt.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 19 bis 21, worin das Gerät Mittel zum Heizen der Reaktionskammer umfaßt.
23. Vorrichtung nach Anspruch 10, die weiters ein Gerät zur Verwendung in Kombination mit dem Substrat umfaßt, wobei das Gerät umfaßt:
  - Mittel zum Halten des Substrats; und
  - optische Ausrüstung zum Betrachten des Inhalts des Mesoscale-Durchflußsystems im Substrat.
24. Vorrichtung nach Anspruch 23, worin die optische Ausrüstung eine Vergrößerungsoptik und eine Videokamera umfaßt und worin das Gerät weiters umfaßt:
  - einen Kippmechanismus zum manuellen Einstellen des Winkels und der Position der Vorrichtung; und
  - einen Videobildschirm zum Betrachten des Inhalts des Durchflußsystems.
25. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin die Amplifizierungskammer ein vorbestimmtes Polynukleotid und Polynukleotid-Amplifizierungsreagenzien umfaßt.
26. Vorrichtung nach Anspruch 25, worin das Durchflußsystem weiters eine Detektionskammer in Fluidkommunikation mit der Amplifizierungskammer umfaßt.
27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 19 bis 26, die weiters ein Gerät zur Verwendung in Kombination mit dem Substrat umfaßt, wobei das Gerät umfaßt:
  - eine Aufnahmestelle zum Beinhalten des Substrats, die ein Fluidzufuhrmittel umfaßt, das mit einer Einlaßöffnung auf dem Substrat ineinanderpaßt.
28. Vorrichtung nach Anspruch 27, worin die Vorrichtung elektrische Kontakte umfaßt, die in das Substrat eingearbeitet sind; und

worin die Aufnahmestelle weiters einen elektrischen Anschluß umfaßt, der mit dem elektrischen Kontakt im Substrat ineinanderpaßt.

29. Vorrichtung nach Anspruch 27 oder 28, worin das Gerät weiters ein Pumpmittel umfaßt, um Fluid durch das Durchflußsystem des Substrats zu leiten, wenn es im Haltemittel gehalten wird.

30. Vorrichtung nach Anspruch 29, worin das Durchflußsystem weiters eine Detektionskammer umfaßt, die in Fluidkommunikation mit der Reaktionskammer steht.

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 30, worin das Gerät weiters eine Stromzufuhr umfaßt.

32. Verfahren zum Amplifizieren eines vorbestimmten Polynukleotids in einer Probe durch Durchführung einer Polynukleotid-Amplifizierungsreaktion, wobei das Verfahren umfaßt:

- (i) das Bereitstellen der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 31,
- (ii) das Abgeben eines Proben-Polynukleotids und von Reagenzien, die für eine Polynukleotid-Amplifizierungsreaktion *in vitro* erforderlich sind, durch die Einlaßöffnung und das Mesoscale-Durchflußsystem an die Reaktionskammer in der Vorrichtung; und
- (iii) das thermische Regulieren der Temperatur des Inhalts der Kammer, um Amplifizierung des Polynukleotids zu ermöglichen.

33. Verfahren nach Anspruch 32, worin Schritt (iii) folgende Schritte umfaßt:

- (a) das thermische Regulieren der Temperatur des Inhalts des ersten Abschnitts auf eine Temperatur, um doppelstrangiges Polynukleotid abzutrennen, und des Inhalts des zweiten Abschnitts auf eine Temperatur, um das Annelieren komplementärer Bereiche von einstrangigem Polynukleotid und die Amplifizierung von Polynukleotid zu ermöglichen; und

(b) das wiederholte Transportieren des Inhalts der Kammer zwischen dem ersten und dem zweiten Abschnitt, um mehrere Amplifizierungszyklen des Polynukleotids durchzuführen.

34. Verfahren nach Anspruch 32, worin Schritt (iii) folgenden Schritt umfaßt:

(a) das thermische Regulieren der Temperatur des Inhalts des ersten Abschnitts in der Kammer und das wiederholte Transportieren des Inhalts der Kammer zwischen dem ersten und dem zweiten Abschnitt, um mehrere Amplifizierungszyklen des Polynukleotids durchzuführen.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 34, worin die Vorrichtung weiters Mittel zum Detektieren des amplifizierten Polynukleotids umfaßt und worin das Verfahren weiters umfaßt:

(iv) das Detektieren des amplifizierten Polynukleotids.

36. Verfahren nach Anspruch 35, worin das Detektionsmittel Mittel zum Detektieren von Widerstand gegen die Strömung der Flüssigkeit in der Kammer, verursacht durch Polynukleotidaggregation, umfaßt; und

worin Schritt (iv) den Schritt des Detektierens von Strömungswiderstand mit dem Detektionsmittel umfaßt.

37. Verfahren nach Anspruch 35, worin das Mittel zum Detektieren des amplifizierten Polynukleotids einen Mesoscale-Detektionsbereich umfaßt, der innerhalb des Substrats in Fluidkommunikation mit der Reaktionskammer angeordnet ist; und

worin die Vorrichtung weiters Mittel zum Herbeiführen von Strömung durch die Reaktionskammer umfaßt, um das amplifizierte Polynukleotid zum Detektionsbereich zu transportieren; und

worin Schritt (iv) den Schritt des Abgebens der Probe aus der Reaktionskammer zum Detektionsbereich mit dem Transportmittel und des anschließenden Detektierens des amplifizierten Polynukleotids im Detektionsbereich umfaßt.

38. Verfahren nach Anspruch 37, worin der Detektionsbereich eine Polynukleotidsonde umfaßt, die zur detektierbaren Bindung an das Probenpolynukleotid fähig ist; und worin in Schritt (iv) die Bindung des Probenpolynukleotids an die Sonde detektiert wird.
39. Verfahren nach Anspruch 37 oder 38, worin der Detektionsbereich einen Fraktalströmungsbereich in Fluidkommunikation mit dem Durchflußkanal umfaßt, der Gabeungen umfaßt, die zu mehreren sekundären Durchflußkanälen führen; und  
    worin in Schritt (iv) das Strömen von Probenfluid durch den Fraktalströmungsbereich detektiert wird.
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 39, worin die Probe eine Zellprobe ist und die Vorrichtung weiters umfaßt:
  - eine Zell-Lysestruktur, die in Fluidkommunikation mit der Reaktionskammer steht, im Mesoscale-Durchflußsystem zur Lyse einer Zellprobe vor der Abgabe der Probe an die Reaktionskammer; und
  - Mittel zum Herbeiführen von Strömung der Probe durch die Zelllysestruktur in der Reaktionskammer; und
  - worin Schritt (ii) den Schritt der Abgabe der Probe an die Lysestruktur und dann an die Reaktionskammer umfaßt.
41. Verfahren nach Anspruch 40, worin die Vorrichtung weiters umfaßt:
  - einen Zelltrennbereich vor der Zell-Lysestruktur zur selektiven Bindung einer vorbestimmten Zellpopulation, der Bindungsgruppen umfaßt, die zur Bindung der Zellpopulation fähig sind; und
  - worin Schritt (ii) vor der Abgabe der Zellprobe an die Zell-Lysestruktur den Schritt des Abgebens der Probe an den Zelltrennbereich umfaßt:

27.01.99

39

mit einer ersten Strömungsgeschwindigkeit, die ausreichend langsam ist, um die Bindung der Zellpopulation in der Probe durch die Bindungsstellen zu ermöglichen, um die Zellpopulation von der Probe abzutrennen; und

mit einer zweiten höheren Strömungsgeschwindigkeit, die ausreicht, um die abgetrennte Zellpopulation von diesem Bereich an die Zell-Lysestruktur freizusetzen.

27.01.99

40

93 910 907.0  
EP 0 637 999

FIG.1

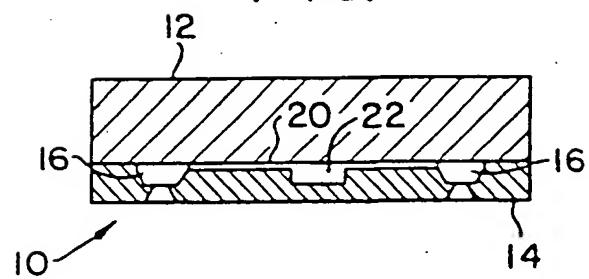
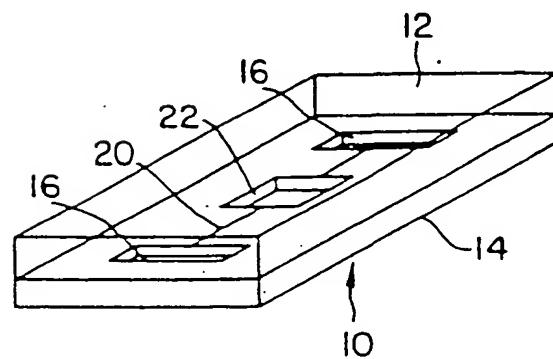


FIG.2



27.01.99

41

FIG. 3A

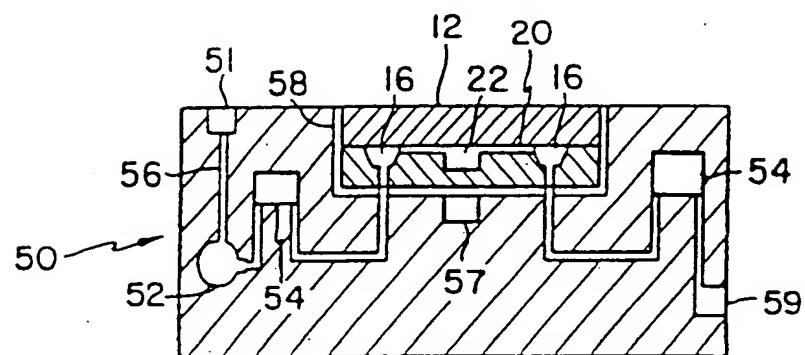
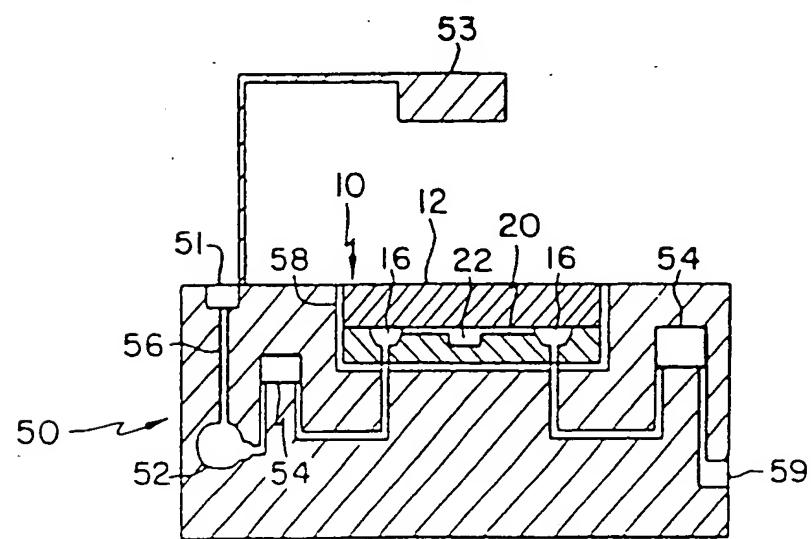


FIG. 3B



27.01.99

42

FIG.4

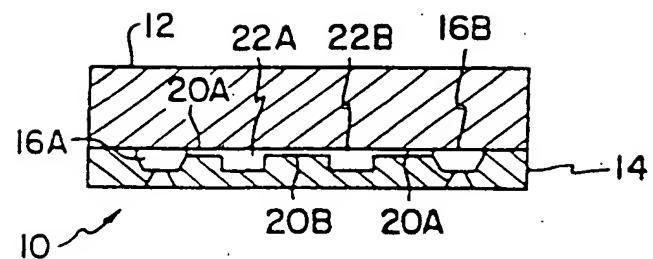
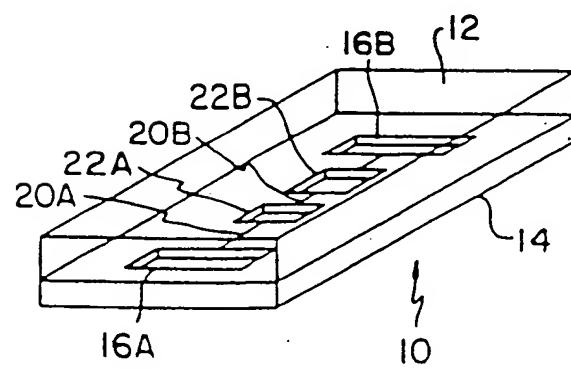


FIG.5



27.01.99

43

FIG.6A

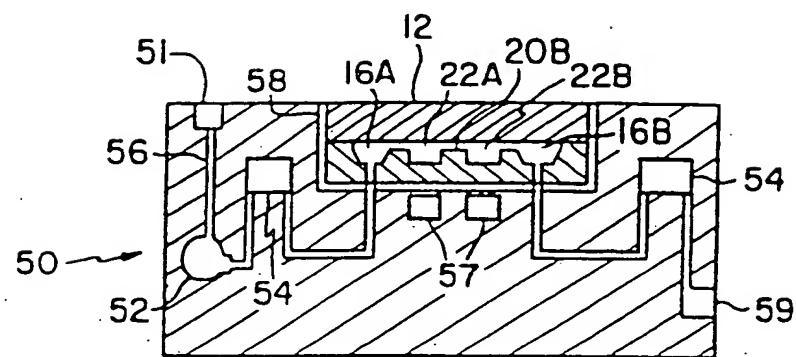
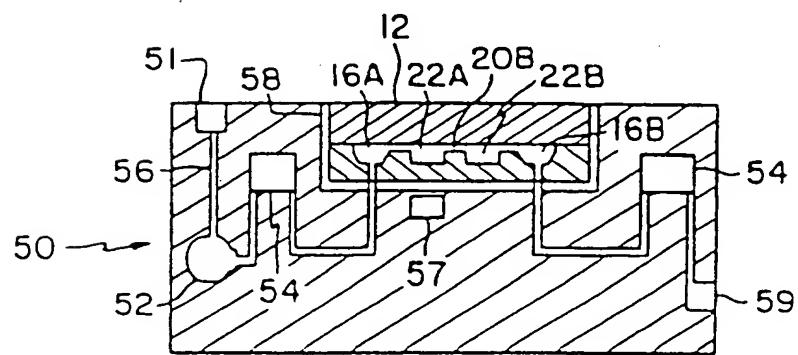


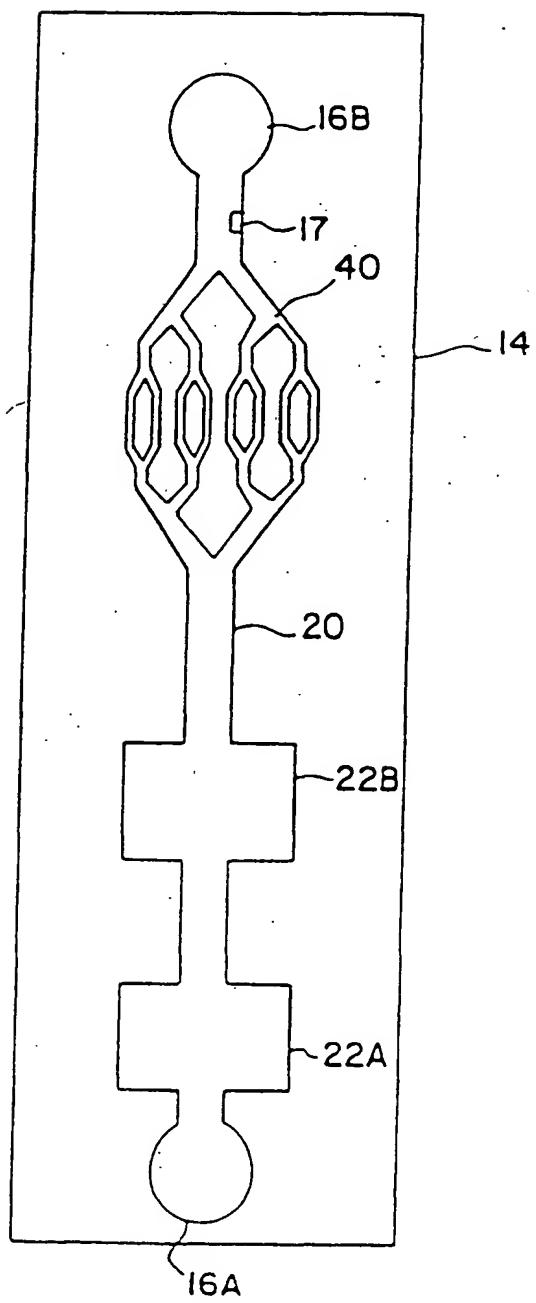
FIG.6B



27-01-99

44

FIG.7



27.01.99  
45

FIG.8

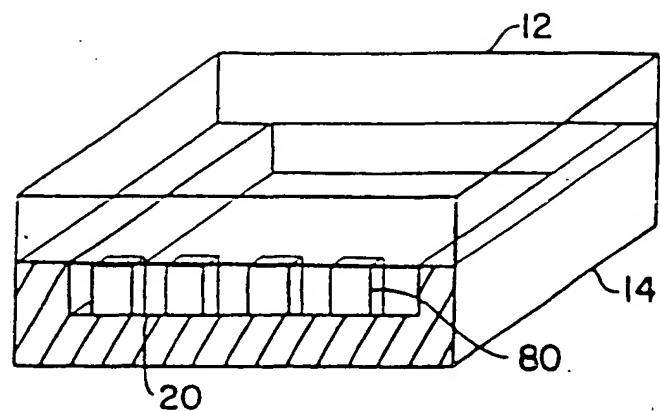


FIG.9

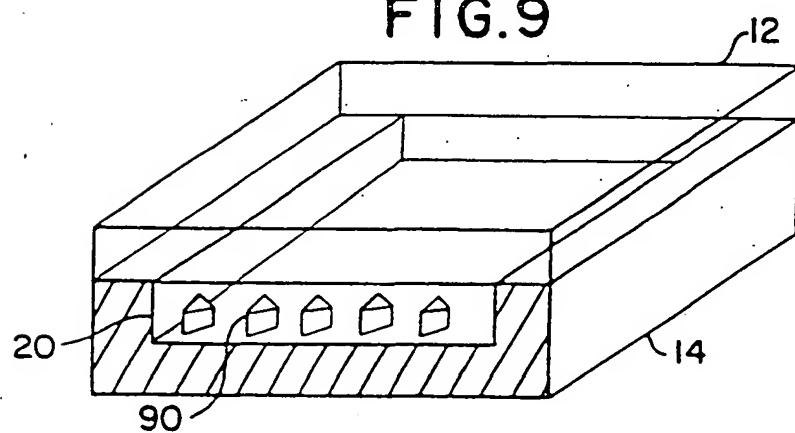
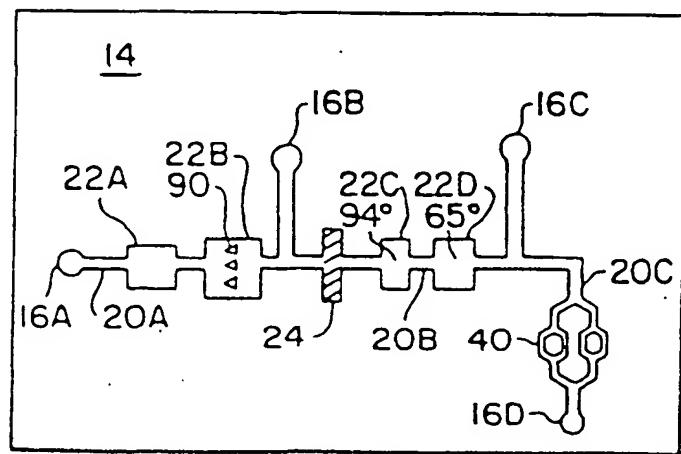


FIG.12

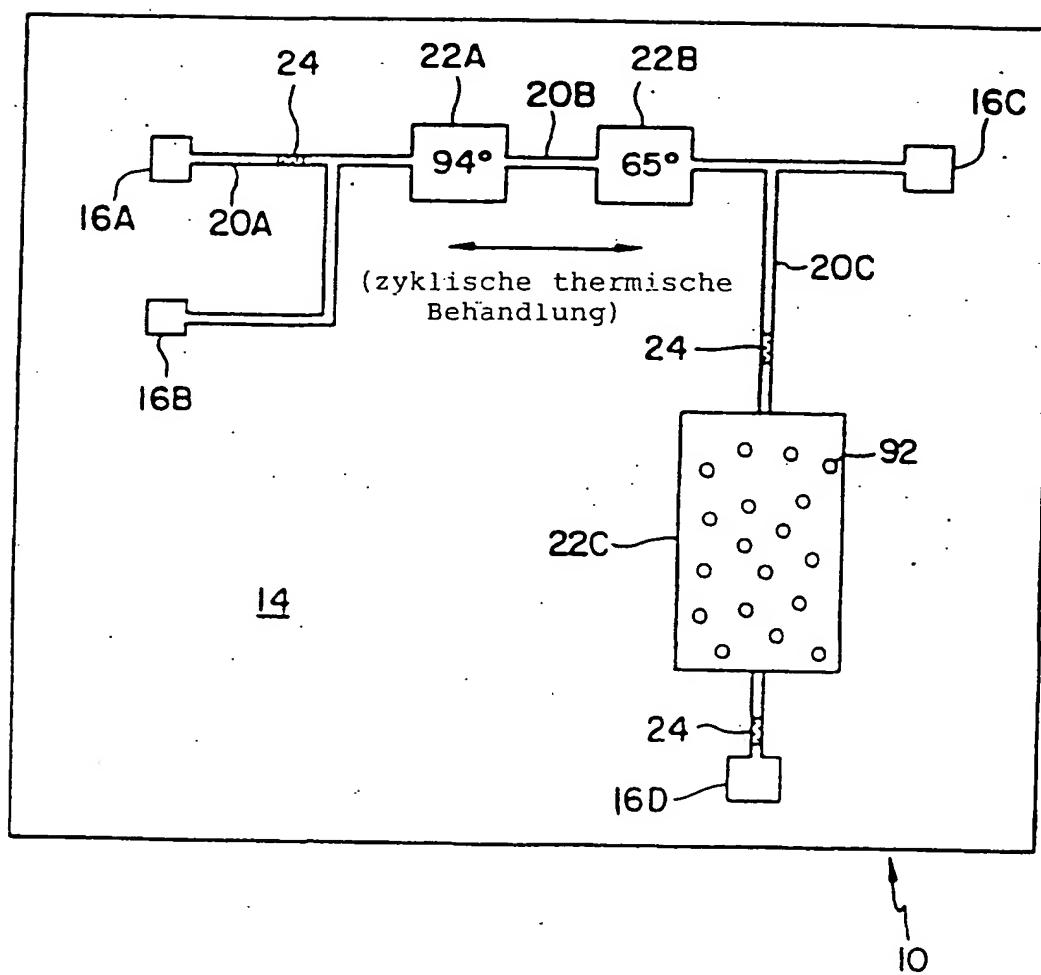


10 ↗

27.01.99

46

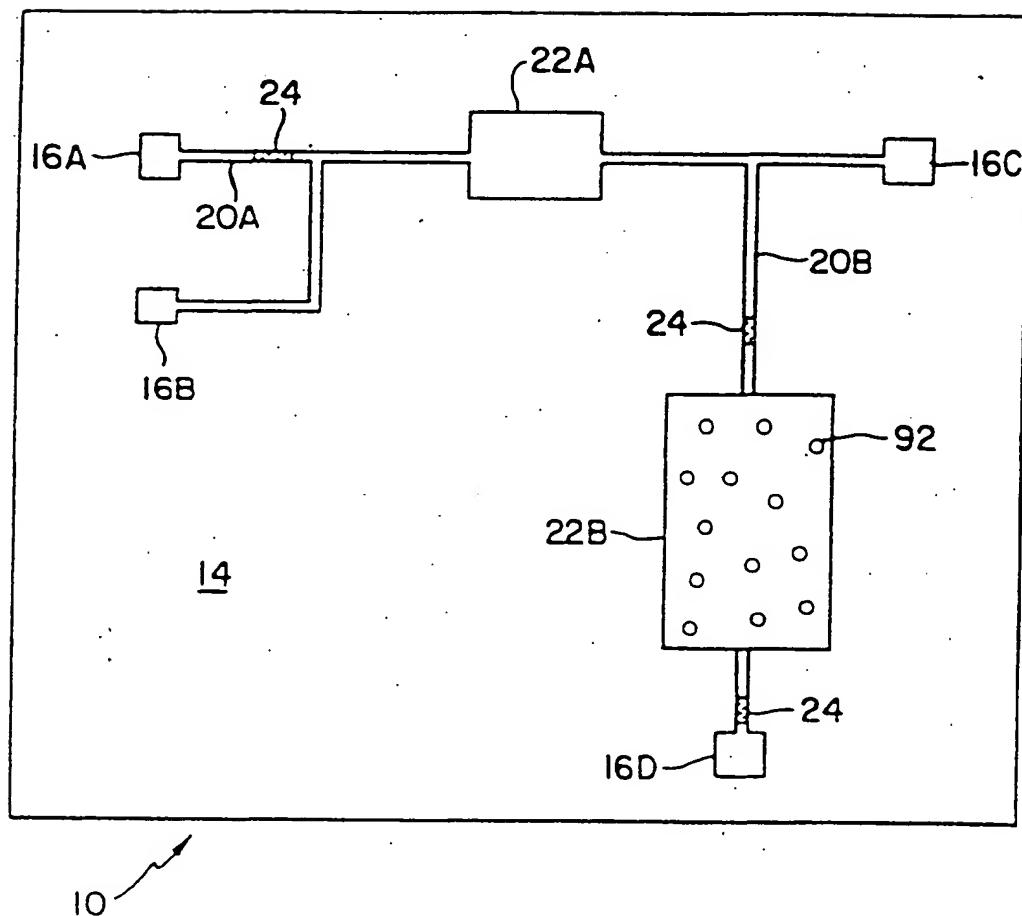
FIG.10



37.01.99

47

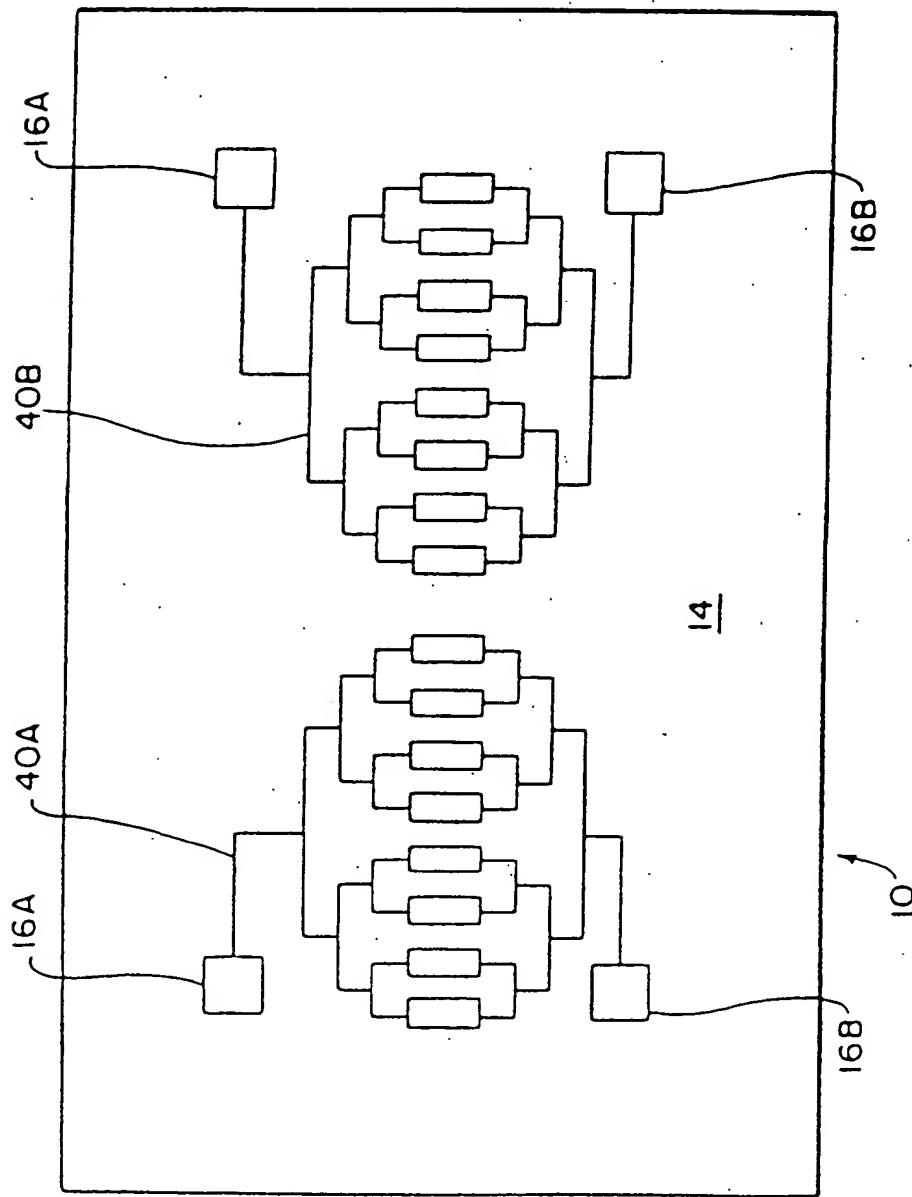
FIG. II



27.01.99

48

FIG. 13



27.01.99  
49

FIG. 14

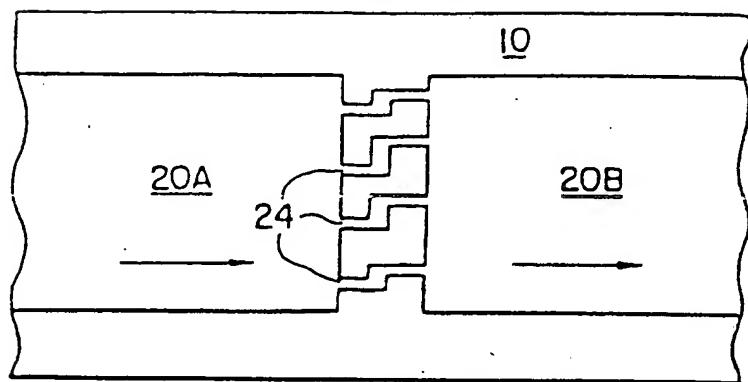


FIG. 15

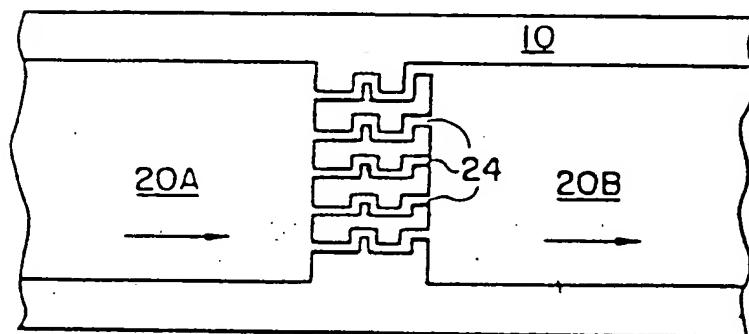
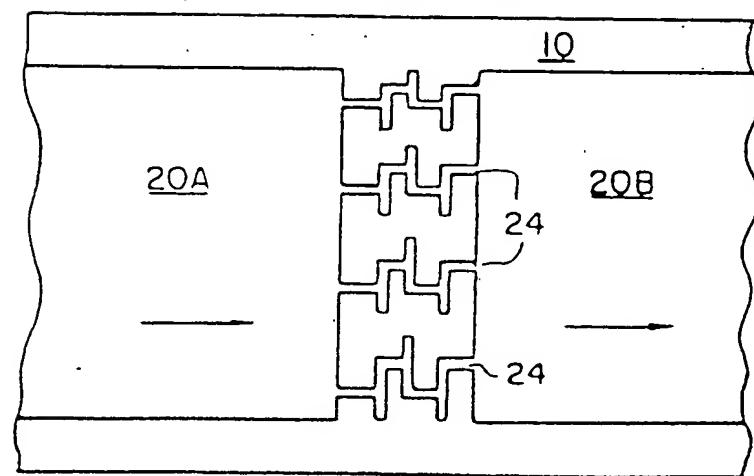


FIG. 16



27.01.99

50

FIG.18

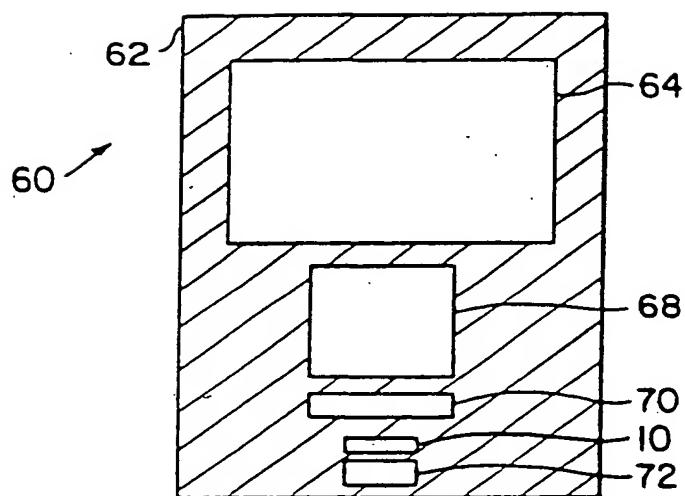
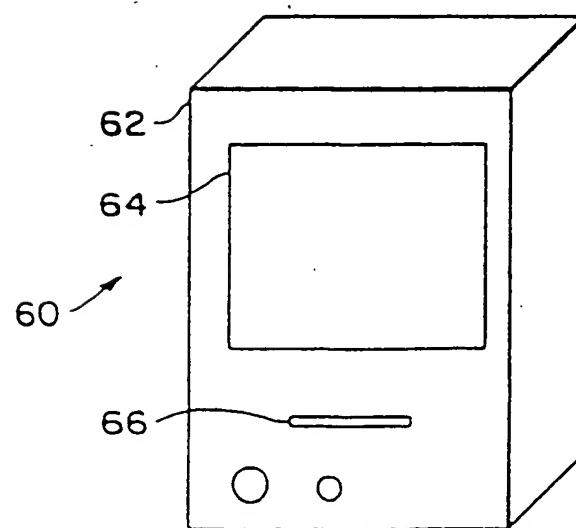


FIG.17

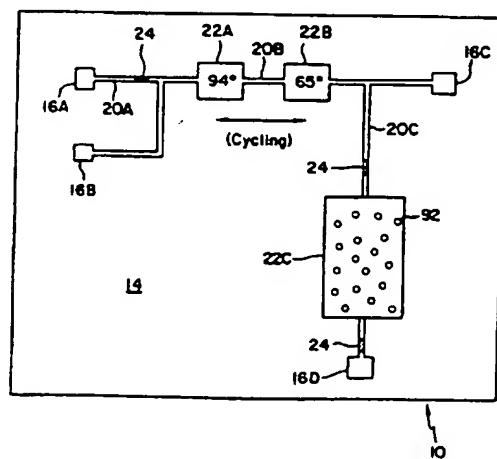




## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| (51) International Patent Classification 5 :<br>B01L 7/00, 3/00, C12Q 1/68<br>B01J 19/00  |  | A1   | (11) International Publication Number: WO 93/22058<br>(43) International Publication Date: 11 November 1993 (11.11.93) |
| (21) International Application Number: PCT/US93/04039<br>(22) International Filing Date: 29 April 1993 (29.04.93)   |  | (74) Agent: PITCHER, Edmund, R.; Testa, Hurwitz & Thibault, Exchange Place, 53 State Street, Boston, MA 02109 (US).  |  |
| (30) Priority data:<br>877,536 1 May 1992 (01.05.92) US<br>877,661 1 May 1992 (01.05.92) US<br>877,662 1 May 1992 (01.05.92) US<br>877,701 1 May 1992 (01.05.92) US<br>877,702 1 May 1992 (01.05.92) US |  | (81) Designated States: AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Published</b><br><i>With international search report.</i><br><i>With amended claims.</i> |  |
| (71) Applicant: TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA [US/US]; 3700 Market Street, Suite 300, Philadelphia, PA 19104 (US).   |  | <b>Date of publication of the amended claims:</b><br>09 December 1993 (09.12.93)   |  |
| (72) Inventors: WILDING, Peter ; 208 Darby Road, Paoli, PA 19301 (US). KRICKA, Larry, J. ; 886 Nathan Hale Road, Berwyn, PA 19312 (US).   |  |  |  |

## (54) Title: POLYNUCLEOTIDE AMPLIFICATION ANALYSIS USING A MICROFABRICATED DEVICE



## (57) Abstract

Disclosed are devices for amplifying a preselected polynucleotide in a sample by conducting a polynucleotide polymerization reaction. The devices comprise a substrate microfabricated to define a sample inlet port (16A) and a mesoscale flow system (20), which extends from the inlet port (16A). The mesoscale flow system (20) includes a polynucleotide polymerization reaction chamber (22) in fluid communication with the inlet port which is provided with reagents required for polymerization and amplification of a preselected polynucleotide. In one embodiment the devices may be utilized to implement a polymerase chain reaction (PCR) in the reaction chamber (PCR chamber). The PCR chamber (22) is provided with the sample polynucleotide, polymerase, nucleoside triphosphates, primers and other reagents required for the polymerase chain reaction, and the device is provided with means for thermally controlling the temperature of the contents of the reaction chamber at a temperature controlled to dehybridize double stranded polynucleotide, to anneal the primers, and to polymerize and amplify the polynucleotide.